



HAL
open science

Immunogénicité d'un candidat vaccin contre le paludisme associé à la grossesse : réponses immunitaires cellulaires induites par l'antigène PAMVAC au cours d'un essai de phase Ib

Tatiana Hountohotegbe

► To cite this version:

Tatiana Hountohotegbe. Immunogénicité d'un candidat vaccin contre le paludisme associé à la grossesse : réponses immunitaires cellulaires induites par l'antigène PAMVAC au cours d'un essai de phase Ib. Immunologie. Université Paris Cité; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2022. Français. NNT : 2022UNIP5060 . tel-04785966

HAL Id: tel-04785966

<https://theses.hal.science/tel-04785966v1>

Submitted on 15 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE PARIS / FRANCE
ECOLE DOCTORALE BIO SORBONNE PARIS CITE (ED562)

En cotutelle avec
UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI / BENIN
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA SANTE

**Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur d'Université de PARIS**

Et

Docteur d'Université d'Abomey-Calavi
Discipline : **IMMUNOLOGIE**

Par :

Tatiana HOUNTOHOTEGBE

Titre :

**Immunogénicité d'un candidat vaccin contre le
paludisme associé à la grossesse : Réponses immunitaires
cellulaires induites par l'antigène PAMVAC au cours d'un essai
de phase Ib**

Soutenue le 17 Février 2022

Jury

Mme Maguette Sylla NIANG	Professeur	Université Cheikh Anta Diop	Rapporteur
Mme Agnes AUBOUY	DR	Université Toulouse III	Rapporteur
Mr Benjamin MORDMÜLLER	Professeur	Université Radboud	Examineur
Mr Babacar MBENGUE	Professeur	Université Cheikh Anta Diop	Examineur
Mr Adrian JF LUTY	DR	Université de Paris	Directeur de thèse
Mr André BIGOT	Professeur	Université d'Abomey-Calavi	Co-Directeur de thèse
Mme Nadine FIEVET	HDR	Université de Paris	Membre invité
Mr Achille MASSOUGBODJI	Professeur	Université d'Abomey-Calavi	Membre invité

Remerciements

A Dieu la gloire pour ce travail

Sincères remerciements,

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à son aboutissement

Aux membres du jury

Au Professeur André Bigot, pour l'encouragement, le soutien et la confiance. Extrême reconnaissance

Au Docteur Adrian JF Luty, pour la conduite de cette thèse, la patience, la disponibilité et le soutien. Profonde gratitude

A Nadine Fievet, pour la disponibilité et les conseils scientifiques.

Au Professeur Stephen Rogerson, for the opportunity you gave and the advices

A Wina Hasang, thanks for the technical advices

A toute l'équipe de Malaria Lab, Peter Doherty Institute, particulièrement à Amaya Ortega et Elisabeth Aitken, it was a pleasure working with you

A Selorme Adukpo, thanks for the hospitality and the scientific advices

Aux Professeurs Achille Massougbodji, Kinde Gazard, Aurore Hounto et Yolande Sissinto

A toute l'équipe de l'IRD au Bénin et à Paris

Aux volontaires et aux infirmières pour l'immense travail accompli.

Aux partenaires de l'étude PAMVAC

A mes collègues du CERPAGE Atikath, Darius, Euripide, Stephanie, Firmine, Aurax, Pépin, merci pour les bons moments

A Sophie, Sévérin, Joseph, Honoré et Ginette

A Déo-Gracias, Jean-Claude et Jérémie, merci pour la collaboration

Aux Docteurs Komi Gbedande, Manfred Accrombessi, Gino Agbota, Leonidas Tokplonou et Sem Ezinmegnon, pour les conseils

A Marlyse, Gisèle, Flavia, Razack, Jules, Audrey, Nawal, Murielle, votre amitié est d'une grande utilité

A Assirius et Mawudjlo, pour l'affection

A mes parents, Bertrand, mes soeurs Evelyne et Maryse.

TABLE DES MATIERES

<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	<i>vii</i>
<i>RESUME</i>	<i>x</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xii</i>
<i>INTRODUCTION</i>	<i>1</i>
<i>Première partie : Revue bibliographique</i>	<i>5</i>
<i>CHAPITRE 1 : Généralités sur le paludisme</i>	<i>6</i>
<i>1.1 Les agents pathogènes</i>	<i>6</i>
1.1.1. La transmission du <i>Plasmodium</i>	<i>7</i>
1.1.2 Le vecteur du <i>Plasmodium</i>	<i>10</i>
1.1.3 Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	<i>10</i>
<i>1.2 La physiopathologie du paludisme</i>	<i>14</i>
1.2.1 La cytoadhérence, la séquestration et le rosetting	<i>16</i>
1.2.2 Facteurs de susceptibilité ou de résistance.....	<i>19</i>
<i>1.3 Les aspects cliniques</i>	<i>20</i>
1.3.1 L'accès palustre simple ou paludisme non compliqué.....	<i>20</i>
1.3.2 L'accès palustre grave	<i>22</i>
<i>1.4 Le diagnostic biologique du paludisme</i>	<i>24</i>
1.4.1 Les techniques microscopiques	<i>24</i>
1.4.2 La détection des protéines plasmodiales par immuno-chromatographie	<i>26</i>
1.4.3 Les méthodes d'amplification génique	<i>27</i>
1.4.4 Les méthodes sérologiques.....	<i>28</i>
<i>1.5 Les moyens de lutte</i>	<i>29</i>
1.5.1 La prévention.....	<i>29</i>
1.5.2 Le traitement curatif.....	<i>40</i>
<i>1.6 Immunité anti-palustre</i>	<i>44</i>

1.6.1	Immunité innée	44
1.6.2	Réponses immunitaires innées contre le <i>Plasmodium</i>	48
1.6.3	Immunité adaptative	51
<i>CHAPITRE 2 : Le paludisme associé à la grossesse (PAG)</i>		58
2.1	<i>Généralités sur le PAG.....</i>	58
2.1.1	Epidémiologie du PAG.....	58
2.1.2	Pathogenèse du PAG	59
2.1.3	Diagnostic du PAG	61
2.1.4	La lutte contre le PAG	62
2.2	<i>Immunité au cours de la grossesse</i>	63
2.2.1	Interfaces fœto-maternelles	63
2.2.2	Mécanismes protecteurs mis en place.....	65
2.2.3	L'immunité lors de l'implantation du trophoblaste.....	66
2.2.4	Profil cytokinique gestationnel.....	67
2.3	<i>Réponses immunitaires au cours du PAG.....</i>	69
2.3.1	Réponses immunitaires cellulaires.....	69
2.3.2	Réponses anticorps spécifiques	71
2.3.3	Cytokines et chimiokines	73
2.4	<i>Conséquences du PAG.....</i>	73
2.4.1	Conséquences chez la mère.....	74
2.4.2	Conséquences chez le fœtus	74
<i>CHAPITRE 3 : PAMVAC, un candidat vaccin contre le PAG.....</i>		76
3.1	<i>Développement d'un vaccin contre le PAG.....</i>	76
3.1.1	La protéine VAR2CSA	76
3.1.2	Identification de candidats vaccins à base de VAR2CSA.....	76
3.1.3	Le candidat vaccin PAMVAC	77

<i>DEUXIEME PARTIE : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE THESE</i>	78
<i>TROISIEME PARTIE : CADRES ET METHODES DES ETUDES</i>	81
<i>CHAPITRE 1: Etude retrospective longitudinale sur la cohorte STOPPAM de femmes enceintes</i>	83
<i>1.1 Description du projet STOPPAM</i>	83
<i>1.2 Etude des profils de cytokines au cours de la grossesse chez des femmes béninoises exposées au paludisme</i>	85
<i>CHAPITRE 2 : Quantification des réponses mémoires naturelles et celles induites par le candidat vaccin PAMVAC</i>	87
<i>2.1 Projet PlacMalVac</i>	87
<i>2.2 Etude PAMVAC</i>	88
2.2.1 Description de l'étude PAMVAC.....	88
2.2.2 Echantillonnage	88
<i>2.3 Etude de la réponse mémoire via la stimulation des cellules mononuclées</i>	90
2.3.1 Quantification des cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal.....	90
2.3.2 Détermination des profils de cytokine dans le surnageant de culture de CMN après la stimulation avec l'antigène vaccinal.....	91
2.3.3 Caractérisation des phénotypes de cellules mémoires	92
<i>CHAPITRE 3: Analyses statistiques</i>	95
<i>QUATRIEME PARTIE: RESULTATS</i>	96
<i>ARTICLE 1: Circulating cytokines associated with poor pregnancy outcomes in beninese exposed to infection with Plasmodium falciparum</i>	97
<i>ARTICLE 2: PAMVAC placental malaria vaccine development: adjuvant choice affects the strength and duration of B and T cell responses</i>	115
<i>DISCUSSION GENERALE</i>	144
<i>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i>	154
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	156

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES 201

LISTE DES ABREVIATIONS

AMA-1	Apical membrane antigen 1
ABC	LB activé
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
aMBC	LB mémoire atypique
ARN	ARN ribosomique
ARN	Acide ribonucleique
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Serum albumine bovine
CBA	Cytometric bead array
CD	Cellule dendritique
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
cMBC	LB mémoire classique
CMN	Cellule mononuclée
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CPDA	Citrate phosphate dextrose adenine
CPN	Consultation prénatale
CR1	Récepteur 1 du complément
CSA	Chondroïtine sulfate
CSA	Chondroïtine sulfate A
CTA	Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine
DAF	Decay-accelerating factor
DAMP	Danger-associated molecular patterns
DARC	Duffy antigen receptor for chemokine
DBL-EBP	Duffy-binding-like erythrocyte-binding protein
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
EBA	Erythrocyte binding antigen
EGF	Epidermal growth factor
EPCR	Endothelial protein C receptor
G6PD	Glucose-6-phosphate deshydrogénase
GLA-SE	Glucopyranosyl lipid adjuvant-stable emulsion
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

GR	Globule rouge
GRi	Globule rouge infecté
HbC	Hémoglobine C
HbS	Hémoglobine S
HLA	Human leucocyte antigen
iBC	LB immature
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire 1
IFA	Immunofluorescence indirect
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
INC	Inclusion
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LIF	Leukaemia inhibitory factor
LSA	Antigène du stade hépatique
mBC	LB mature
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MGG	May grünwald giemsa
MILD	Moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action
MIP	Macrophage inflammatory protein
MSP1	Protéine 1 de surface du mérozoïte
MTC	LT mémoire
NBC	LB naïf
NO	Oxyde nitrique
NTC	LT naïf
OMS	Organistaion mondiale de la santé
PAG	Paludisme associé à la grossesse
PAM	Pregnancy-associated malaria
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PAMVAC	Pregnancy-associated malaria vaccine
PCR	Polymerase chain reaction
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
<i>pf</i> EMP1	Protéine membranaire érythrocytaire de <i>P. falciparum</i> 1

<i>Pf</i> GRI	Globule rouge infecté par <i>P falciparum</i>
<i>Pf</i> HRP2	<i>P falciparum</i> histidine rich protein-2
<i>Pf</i> Rh	<i>P falciparum</i> reticulocyte-binding homologue
PIBF	Progesterone-induced blocking factor
PlacMalVac	Placental malaria vaccine
pLDH	Lactate déshydrogénase plasmodiale
PRR	Récepteur de reconnaissance des pathogènes
PTB	Preterm birth baby
PvDBP	<i>P. vivax</i> duffy binding protein
QBC	Quantitative buffy coat
SGA	Small for gestational age
SP	Sulfadoxine – pyriméthamine
STOPPAM	Strategies to prevent pregnancy-associated malaria
TBV	Transmission blocking vaccine
TCM	LT mémoire centraux
TDR	Test de diagnostic rapide
TEM	LT mémoire effecteur
TEMRA	LT mémoire effecteur différencié
Tfh	Lymphocyte T folliculaire
Tfh	LT mémoire folliculaire
TfR1	Transferrine receptor 1
TLR	Toll like receptor
TPI	Traitement préventif intermittent
TRAP	Protéine d'adhésion associée à la thrombospondine
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor

RESUME

L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer les réponses cellulaires mémoires induites par la vaccination contre le paludisme associé à la grossesse (PAG). Le vaccin PAMVAC en phase I d'essai clinique a fait l'objet de la présente étude. Le projet PAMVAC a pour objectif d'étudier l'immunogénicité et l'innocuité du candidat vaccin. Il fait partie du projet PlacMalVac qui avait pour objectif le développement clinique d'un vaccin contre le PAG. Au cours du projet PAMVAC, nous avons réalisé le suivi de 21 femmes nulligestes qui ont reçu soit le candidat vaccin PAMVAC soit un placebo. Cependant grâce aux données collectées au cours des projets PlacMalVac et STOPPAM nous avons pu comparer nos résultats à ceux découlant de l'histoire naturelle du PAG.

Dans la première partie de ce travail, nous avons déterminé les profils de cytokines au cours de la grossesse dans un échantillon de 400 femmes sélectionnées à partir de la grande cohorte du projet STOPPAM. Nous avons analysé l'effet de la présence d'infection palustre sur les taux de cytokines mesurées à différents temps, l'influence des taux de cytokines mesurées à l'inclusion sur le risque de survenue d'infection palustre au cours de la grossesse et l'impact des infections survenues au cours de la grossesse sur les taux de cytokines mesurées à l'accouchement. Nos résultats montrent d'une part une association entre les taux élevés d'IL-10 et la présence d'infection palustre au cours de la grossesse et à l'accouchement. D'autre part nous avons observé une association entre les faibles niveaux d'IL-5 mesurés à l'accouchement et la survenue de la prématurité et du faible poids de naissance. Au total, nos résultats suggèrent un effet immunosuppresseur de l'IL-10 sur la balance cytokinique de la grossesse chez les femmes infectées et renforce l'hypothèse de l'intérêt diagnostique ou pronostic des cytokines au cours du paludisme associé à la grossesse.

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des réponses cellulaires mémoires T et B induites par le candidat vaccin PAMVAC. Pour cela, nous avons analysé les profils des cytokines dans le surnageant de culture des cellules mononucléées (CMN) collectées au cours de l'étude PAMVAC. Nous avons observé des tendances vers des concentrations élevées de cytokines de type Th1 et Th2. Cependant, l'amplitude des concentrations des cytokines de type Th2 semblait plus élevée après la vaccination dans le groupe Alhydrogel. Ensuite, nous avons déterminé la fréquence des cellules B mémoires spécifiques à travers la quantification des cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques. Nos résultats ont montré que le vaccin PAMVAC induit des réponses B mémoires qui augmentaient considérablement dans le groupe GLA-SE. Enfin, nous avons caractérisé les

phénotypes des cellules T et B mémoires induites par le vaccin PAMVAC à partir des CMN. Nous avons observé une augmentation de la fréquence des lymphocytes Tfh de type Th2 chez les vaccinées du groupe GLA-SE. Au total nous avons identifié des différences de réponses en fonction de l'adjuvant utilisé.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus permettent d'évaluer la qualité et l'amplitude des réponses cellulaires dirigées contre le candidat vaccin PAMVAC en vue de la poursuite de son développement clinique.

Mots clés : Vaccin, paludisme associé à la grossesse, réponse cellulaire mémoire, cytokine, lymphocyte T, lymphocyte B, adjuvant

ABSTRACT

The main objective of this work was to investigate cellular memory responses induced by immunization against pregnancy-associated malaria (PAM). The current work focused on PAMVAC vaccine that has completed a phase I clinical trial. The aim of PAMVAC project was to evaluate the immunogenicity and safety of the vaccine candidate. This project is part of PlacMalVac project, which aimed at the clinical development of a vaccine against PAM. During PAMVAC study, twenty-one nulligravid women were followed-up and received either PAMVAC vaccine or a placebo. However, we made use of data collected during PlacMalVac and STOPPAM projects and we were able to compare our results with those derived from the natural history of PAM.

In the first part of this work, we investigated the cytokine profiles during pregnancy among 400 pregnant women selected from the large STOPPAM cohort. We analyzed the effect of malaria infection on cytokine levels measured at different times, the influence of cytokine levels measured at inclusion on the risk of malaria infection during pregnancy and the impact of infections occurring during pregnancy on cytokine levels measured at delivery. Firstly, our results showed an association between high levels of IL-10 and malaria infection during pregnancy and at delivery. Secondly, we observed an association between low levels of IL-5 measured at delivery and occurrence of prematurity and low birth weight. Overall, our results suggest an immunosuppressive effect of IL-10 on the cytokine balance of pregnancy in infected women and strengthen the hypothesis of the use of cytokines as diagnosis or prognosis markers during PAM.

In the second part of this work, we were interested by characterization of memory T and B cell responses induced by the PAMVAC vaccine candidate. For this purpose, we analyzed the cytokine profiles in the culture supernatant of peripheral mononuclear cells (PBMC) collected during the PAMVAC study. We observed some trends towards high concentrations of Th1 and Th2 cytokines. However, the magnitude of Th2 cytokine concentrations appeared higher after vaccination in Alhydrogel group. We also determined the frequency of specific memory B cells through the quantification of specific antibody-secreting cells. Our results showed the PAMVAC vaccine induced memory B responses that were significantly increased in GLA-SE group. Finally, we characterized the phenotypes of PAMVAC vaccine-induced memory T and B cells from PBMC. We observed an increase in the frequency of Tfh Th2-type in GLA-SE group. In general, we identified some differences in responses depending on the adjuvant used.

The data generated in this work provide new insight into the quality and quantity of the cellular responses directed against PAMVAC vaccine candidate for its further development.

Key words: Vaccine, pregnancy-associated malaria, *P. falciparum* , cellular memory response, cytokine, T cell, B cell, adjuvant

Title: Immunogenicity of a pregnancy associated malaria vaccine candidate: PAMVAC induced cellular immune responses during a phase Ib clinical trial.

INTRODUCTION

Le paludisme est une affection fébrile aigüe due à des parasites du genre *Plasmodium* transmis par la piqure de moustique femelle infectée du genre *Anophèles* (1).

En 2019, l'OMS estimait à 229 millions le nombre de cas de paludisme dans le monde dont 409 000 décès. Les enfants âgés de moins de 5 ans constituant le groupe le plus vulnérable, représentaient 67% des décès (1).

Sur le plan géographique, la répartition mondiale du paludisme est disproportionnée (**Figure 1**). La région africaine de l'OMS a supporté 94% des cas des décès imputables au paludisme. Elle est suivie de l'Asie du Sud-Est et de la méditerranée orientale représentant respectivement 3,4% et 2,1% des cas en 2018 (2).

Parmi les espèces de parasites responsables du paludisme chez l'homme, *P. falciparum* et *P. vivax* sont les plus dangereuses. *P. falciparum* est responsable de la plupart des cas estimés dont 99% en Afrique, 50% en Asie du Sud-Est, 71% en Méditerranée orientale et 65% dans le Pacifique oriental. Par ailleurs, *P. vivax* prédomine en Asie du Sud-Est et en Amérique où sont notés respectivement 53% des cas de paludisme à *P. vivax* et 75% des cas de paludisme observés en général (2).

Les fonds investis dans la recherche et le développement de produits contre le paludisme ont connu une hausse et sont estimés en 2018 à 2,7 milliards de dollars. Cependant, même si les objectifs de la stratégie technique mondiale pour 2020 ne sont pas atteints, une progression de l'élimination du paludisme est notée.

À l'échelle mondiale, davantage de pays se rapprochent de l'objectif visant à réduire le nombre de cas de paludisme à zéro. Ainsi, 27 pays ont notifié en 2019, moins de 100 cas indigènes de paludisme, contre 6 pays en 2000 (1). Il est à noter que d'importants efforts sont consentis pour la disponibilité des moyens de prévention et de traitement, de même que le diagnostic et la surveillance. Cependant, l'émergence et la recrudescence des phénomènes de résistance aux insecticides et aux antipaludiques constituent un frein à la progression de l'élimination du paludisme (2).

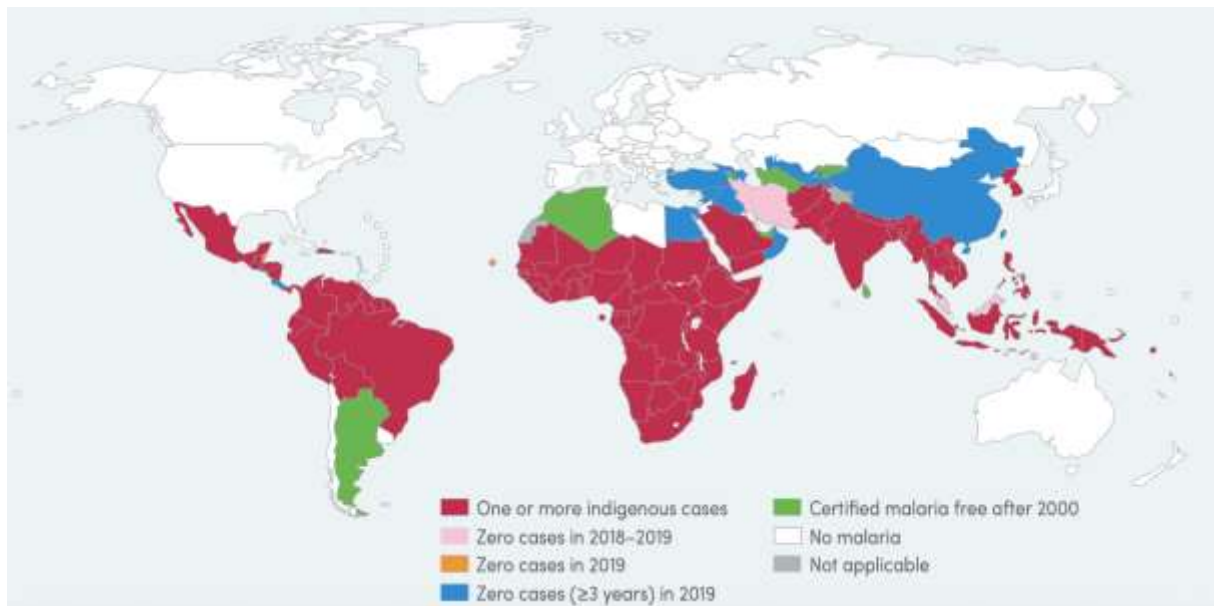


Figure 1 : Répartition du Paludisme dans le monde (2).

Par ailleurs, deux femmes enceintes sur trois n'ont pas reçu en 2019 au moins trois doses de traitement préventif intermittent. De plus, 11,6 millions de cas de paludisme ont été notifiés chez les femmes enceintes et l'on estime à 822 000 le nombre de nourrissons ayant un faible poids à la naissance dans 33 pays (3). La susceptibilité élevée de la femme enceinte à l'infection palustre est liée d'une part à l'immunodépression induite par la tolérance de la greffe fœtale et d'autre part à la séquestration des globules rouges infectés (GRi) par *P. falciparum* dans le placenta. En effet, il existe une interaction entre la chondroïtine sulfate (CSA) placentaire et le VAR2CSA, un antigène parasitaire exprimé à la surface du GRi par *P. falciparum* (pfGRi) (4,5). Dans la plupart des cas, l'infection est asymptomatique avec une densité parasitaire plus élevée au niveau du placenta que dans le sang périphérique (6). Ceci peut toutefois entraîner de graves conséquences pour la mère, le fœtus et le nouveau-né. Chez la femme enceinte, l'infection à *P. falciparum* provoque souvent une anémie et augmente le risque de décès pré- et post-partum. On observe également des accouchements prématurés et des faibles poids de naissance à l'origine de retards de croissance et de développement cognitif, importants facteurs de risque de mortalité infantile, périnatale et néonatale (7,8).

Depuis 2012, l'OMS recommande l'utilisation de moustiquaire imprégnée d'insecticide de longue durée et l'administration d'au moins trois doses d'un traitement préventif intermittent à base de Sulfadoxine – Pyriméthamine dans les zones stables d'endémie palustre d'Afrique sub-saharienne. Malheureusement, cette chimioprophylaxie se heurte également au phénomène de résistance dans de nombreuses régions (**Figure 2**) (9). Pour cela, il est important

de trouver de nouvelles stratégies efficaces pour la prévention du paludisme et ses conséquences au cours de la grossesse.

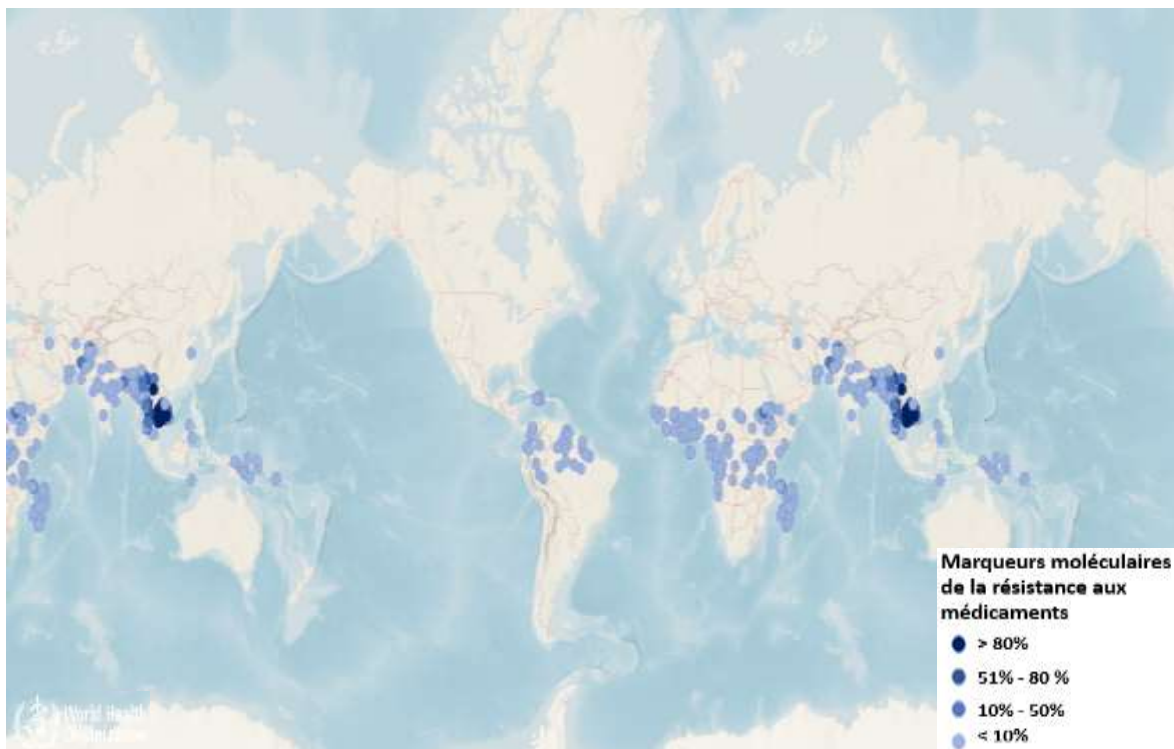


Figure 2 : Répartition géographique des marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments (10).

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : Généralités sur le paludisme

1.1 Les agents pathogènes

Les micro-organismes responsables du paludisme sont des parasites protozoaires appelés plasmodies et appartenant au phylum des *Apicomplexa*. Plus de 200 espèces du genre *Plasmodium* sont capables d'infecter de nombreuses espèces de vertébrés telles que les reptiles, les oiseaux et divers mammifères. Parmi elles, quatre espèces sont considérées comme de véritables parasites de l'homme, car elles utilisent l'homme presque exclusivement comme hôte intermédiaire naturel (11). Cependant, une cinquième espèce qui infecte naturellement les macaques (genre *Macaca*) a récemment été reconnue comme étant une cause de paludisme zoonotique chez l'homme (12).

Les espèces de *Plasmodium* infectant naturellement l'homme sont (13):

- *P. falciparum*, ayant une répartition mondiale dans les régions tropicales et subtropicales, et surtout en Afrique où elle prédomine. *P. falciparum* se multiplie rapidement dans le sang et peut provoquer un paludisme grave avec pour conséquence une anémie. Par ailleurs, les parasites peuvent obstruer les petits vaisseaux sanguins notamment au niveau du cerveau à l'origine d'un paludisme cérébral pouvant être fatal.
- *P. vivax*, retrouvé principalement en Asie, en Amérique latine et dans certaines parties de l'Afrique. En raison des densités de population, en particulier en Asie, c'est probablement le parasite du paludisme le plus répandu chez l'homme. Cette espèce (ainsi que *P. ovale*) possède des stades hépatiques dormants appelés « hypnozoïtes » capables de se réactiver et d'envahir le sang plusieurs mois ou années après la piqûre du moustique infectant responsables de « rechute » clinique.
- *P. ovale*, localisé principalement en Afrique (en particulier en Afrique de l'Ouest) et dans les îles du Pacifique occidental. Il est biologiquement et morphologiquement très semblable à *P. vivax*. Cependant, à l'opposé de *P. vivax*, *P. ovale* peut infecter des individus de groupe sanguin Duffy-négatifs, ce qui est le cas pour de nombreuses populations d'Afrique subsaharienne. Cela explique la prévalence plus élevée de *P. ovale* (plutôt que de *P. vivax*) dans la plupart des pays africains.
- *P. malariae*, présent dans le monde entier, est la seule espèce de parasite du paludisme chez l'homme à avoir un cycle de trois jours. En l'absence de traitement, *P. malariae* provoque une infection chronique de longue durée qui, dans certains cas, peut durer toute une vie. Chez certains patients infectés de façon chronique, *P. malariae* peut entraîner de graves complications telles que le syndrome néphrotique.

- *P. knowlesi*, réparti dans toute l'Asie du Sud-Est où il s'est récemment avéré être une cause importante de paludisme zoonotique, en particulier en Malaisie. Cette espèce a un cycle de réplication de 24 heures et peut ainsi rapidement passer d'une infection simple à une infection grave.

1.1.1. La transmission du *Plasmodium*

1.1.1.1. Les modes de transmission

Le principal mode de transmission du *Plasmodium* est la piqûre de moustique femelle *Anophèles*. Lorsque l'anophèle pique un individu infecté, il aspire les gamétocytes (formes sexuelles du parasite) ainsi que le sang. Ces gamétocytes continuent la phase sexuelle du cycle dans l'intestin du moustique et les sporozoïtes qui se développent, remplissent les glandes salivaires du moustique infesté. Lorsque ce moustique femelle pique un autre individu pour son repas sanguin, les sporozoïtes sont inoculés dans le sang de la nouvelle victime, propageant ainsi l'infection.

Cependant, il existe d'autres modes de transmission du *Plasmodium* ne faisant pas intervenir les anophèles. Il s'agit de :

- Le transfert de GRs parasités de la mère infectée à l'enfant : Il se fait par voie transplacentaire ou pendant le travail et peut entraîner un paludisme chez le nouveau-né, appelé paludisme congénital (14). Le paludisme congénital semble être rarement signalé et a été considéré comme plus fréquent dans la population non immune. Cependant, ces dernières années une prévalence plus élevée de paludisme congénital a été signalée dans les zones d'endémie et non endémiques (15,16). Les quatre espèces de *Plasmodium* infectant naturellement l'homme ont été associées au paludisme congénital bien que la plupart des cas de paludisme chez la mère soient dus à l'infection à *P. falciparum* ou *P. vivax* (17). Dans les pays non endémiques, *P. malariae* peut provoquer un nombre très élevé de cas de paludisme congénital en raison de sa persistance plus longue chez l'hôte (17). Le paludisme congénital survient plus souvent lors de la première grossesse.
- La transmission du *Plasmodium* par transfusion de sang de donneurs infectés à l'origine du paludisme transfusionnel. Cette infection fait partie des infections transmissibles par transfusion les plus courantes (18). Par ailleurs, le risque de transmission du parasite est plus élevé lors de la transfusion de sang total frais que lors de transfusions de plasma, de composants plasmatiques ou de dérivés dépourvus de globules rouges intacts. Cependant, l'inoculum du sang infecté contenant les formes érythrocytaires du *Plasmodium*, la phase

pré-érythrocytaire du cycle de vie ne se produit pas et la période d'incubation est courte de 2 à 4 jours (19).

1.1.1.2 L'endémicité du paludisme

Il décrit l'intensité de transmission qui correspond à la fréquence à laquelle les personnes vivant dans une zone donnée sont piquées par des anophèles porteurs de sporozoïtes de plasmodies qui infectent l'homme. L'intensité de la transmission est souvent exprimée par le taux annuel d'inoculation entomologique qui correspond au nombre moyen d'inoculations de sporozoïtes que l'on estime qu'une personne subit sur une période donnée. Dans la mesure où il est difficile de mesurer le taux d'inoculation entomologique, on utilise souvent la prévalence du paludisme chez les enfants en bas âge comme un indicateur indirect de l'intensité de la transmission (20).

L'intensité de transmission du paludisme dépend des conditions climatiques, telles que le régime des précipitations, la température et l'humidité (température $> 18^{\circ}\text{C}$ pour *P. falciparum* et $> 16^{\circ}$ pour *P. vivax*) et d'altitude (< 1500 m en Afrique). Elle permet de définir la stabilité du paludisme. On distingue ainsi le paludisme de transmission instable caractérisé par une transmission brève, une courte durée de vie de l'anophèle, une faible prémunition, et une forte mortalité à tout âge. A l'opposé, le paludisme de transmission stable se définit par une transmission prolongée, une circulation pérenne, une anthropophilie et espérance de vie longue de l'anophèle, la prémunition rapide, mais une mortalité infantile importante (21). Les populations continuellement exposées à une fréquence élevée de transmission du paludisme (taux d'inoculation entomologique $> 10/\text{an}$), possèdent une immunité partielle aux maladies cliniques et un risque réduit de développer un paludisme grave dans la petite enfance.

Le paludisme stable existe dans toute l'Afrique intertropicale, sauf dans le centre des grandes villes, à une altitude supérieure à 1500 m et dans des zones de transmission faible (Sahel).

Il existe schématiquement cinq faciès épidémiologiques du paludisme en Afrique :

- le faciès équatorial dans la forêt et les savanes post-forestières : La transmission du paludisme y est stable et pérenne avec une forte prémunition dès l'âge de 5 ans.
- le faciès tropical dans les savanes humides : La transmission du paludisme est stable avec une longue saisonnalité (> 6 mois) et une prémunition établie à 10 ans.
- le faciès sahélien des savanes sèches et des steppes : La transmission du paludisme est instable et la saisonnalité courte (< 6 mois). La prémunition est plus longue à établir et liée à la régularité de la transmission.

- le paludisme austral des plateaux du sud de l'Afrique : Il se distingue par une transmission instable et saisonnière, une immunité apparemment peu solide et un risque d'épidémies.
- le paludisme des montagnes entre 1 000 et 1500 m : Il se détermine par une transmission instable et limitée par la température (cap des 18 °C), peu ou pas d'immunité, épidémies violentes, grandes variations interannuelles (température et pluies), problème du réchauffement climatique.

L'endémicité palustre peut également être classée en fonction de l'indice splénique et du taux parasitaire. L'indice splénique est la proportion (exprimée en pourcentage) d'hypertrophie de la rate dans un échantillon de la population, en général les enfants de 2 à 9 ans tandis que le taux parasitaire est la proportion d'une population donnée présentant des parasites du paludisme dans le sang. Ces deux indices permettent de quantifier l'endémicité du paludisme, comme décrit dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Classification de l'endémicité du paludisme en fonction de l'indice splénique et du taux parasitaire (21).

Type	Indice splénique	Taux parasitaire
Hypo-endémicité	≤ 10 % des enfants de 2 à 9 ans	≤ 10 % des enfants de 2 à 9 ans
Méso-endémicité	11 à 50 % des enfants de 2 à 9 ans	11 à 50 % des enfants de 2 à 9 ans
Hyper-endémicité	Toujours > 50 % chez les enfants de 2 à 9 ans ; également élevé chez les adultes (> 25 %)	Toujours > 50 % chez les enfants de 2 à 9 ans
Holo-endémicité	Toujours > 75 % chez les enfants de 2 à 9 ans, mais faible chez les adultes	Toujours > 75 % chez les nourrissons de 0 à 11 mois

Dans les zones d'endémicité élevée, le niveau d'immunité anti-palustre de la population a tendance à être élevé et par conséquent, la prévalence d'infections asymptomatiques est importante. Cependant, dans la région sub-sahélienne, où la transmission du paludisme n'est intense que pendant la saison des pluies de 3 ou 4 mois et relativement faible à d'autres moments, la maladie clinique se limite principalement aux jeunes enfants. Ceux-ci peuvent développer des densités de parasites élevées qui peuvent évoluer très rapidement vers un paludisme grave. En revanche, les adolescents et les adultes sont partiellement immunisés et

souffrent rarement d'une maladie clinique, bien qu'ils continuent souvent d'avoir de faibles densités de parasites sanguins. L'immunité est progressivement perdue, au moins partiellement, lorsque les individus quittent les zones d'endémie pendant de longues périodes (généralement de nombreuses années).

1.1.2 Le vecteur du *Plasmodium*

Le *Plasmodium* est transmis d'homme à homme par l'anophèle femelle, l'un des vecteurs les plus efficaces de maladies humaines. Parmi les 480 espèces d'*Anophèles*, seules 50 transmettent le *Plasmodium*. Diverses espèces se sont avérées être des vecteurs dans différentes parties du monde. Le complexe *An. gambiae* est le principal vecteur en Afrique et *An. freeborni* en Amérique du Nord. En Inde, *An. culicifacies*, *An. fluviatilis*, *An. minimus*, *An. philippinensis*, *An. stephensi*, *An. sundaicus* ont été impliqués dans la transmission du paludisme (13). Des espèces comme *An. stephensi* sont très adaptables et se révèlent être des vecteurs très puissants du paludisme chez l'homme. Par ailleurs, *An. leucosphyrus*, *An. latens*, *An. cracens*, *An. hackeri*, *An. dirus* etc., ont été identifiés comme les vecteurs de la transmission de *P. knowlesi* (22).

La plupart des anophèles sont anthropophiles, endophages, et piquent la nuit avec un pic à minuit, entre 23 h et 2 h (13). Le repas sanguin sur un hôte vertébré est essentiel pour que les moustiques femelles nourrissent leurs œufs. Les anophèles trouvent leur hôte en recherchant des stimuli visuels, thermiques et olfactifs parmi lesquels, le dioxyde de carbone, l'acide lactique, la température de la peau et l'humidité constituent d'importants facteurs d'attraction des moustiques. Toutefois, les anophèles femelles sont plus attirés par les adultes, les hommes et les personnes plus grandes que les autres (23).

1.1.3 Cycle biologique du *Plasmodium*

Le *Plasmodium* a un cycle de vie complexe qui se déroule en plusieurs étapes au sein de deux hôtes, les moustiques vecteurs et les hôtes vertébrés (24) (**Figure 3**). La survie et le développement du parasite au sein de ses hôtes, dans des environnements intracellulaires et extracellulaires, sont rendus possibles grâce à un ensemble de plus de 5000 gènes et protéines spécialisées qui aident le parasite à envahir et croître dans plusieurs types de cellules et à échapper aux réponses immunitaires de l'hôte (25). Le *Plasmodium* passe par plusieurs stades de développement tels que les sporozoïtes (Grec *Sporos* = graines ; la forme infectieuse injectée par le moustique), les mérozoïtes (Grec *Meros* = pièce ; le stade envahissant les érythrocytes), les trophozoïtes (Grec *Trophes* = nourriture ; la forme se multipliant dans les érythrocytes), et

les gamétocytes (stades sexuels). Chaque stade de développement possède des complexes protéiques, une forme et une structure uniques qui leur sont spécifiques. Les voies métaboliques et les protéines de surface changent continuellement au cours de ces différentes étapes, favorisant l'échappement du parasite à la clairance immunitaire, et constituent un obstacle pour le développement de médicaments et de vaccins (25).

L'homme constitue l'hôte intermédiaire du *Plasmodium* au sein duquel la phase asexuée du cycle de vie se déroule en deux étapes.

1.1.3.1 Le stade pré-érythrocytaire

La première étape ou l'étape pré-érythrocytaire correspond à la schizogonie hépatique et qui se déroule dans le foie. Après la piqûre par un moustique infesté, des dizaines à quelques centaines de sporozoïtes invasifs sont introduits dans la peau. Quelques sporozoïtes sont détruits par les macrophages locaux, certains pénètrent dans les vaisseaux lymphatiques et d'autres trouvent un vaisseau sanguin (26,27). Les sporozoïtes qui pénètrent dans un vaisseau lymphatique atteignent le ganglion lymphatique drainant, où certains peuvent partiellement se différencier en stades pré-érythrocytaires (26) et activer également les cellules T pour induire une réponse immunitaire protectrice (28).

Par ailleurs, les sporozoïtes qui trouvent un vaisseau sanguin atteignent le foie en quelques heures. Leur migration s'effectue grâce à la famille des protéines TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) et au complexe actine-myosine (29). Les sporozoïtes diffusent ensuite à travers les sinusoides hépatiques, envahissent quelques hépatocytes, puis se multiplient et se développent au sein de vacuoles parasitophores. Chaque sporozoïte se différencie en un schizonte contenant 10 000 à 30 000 mérozoïtes (ou plus dans le cas de *P. falciparum*) (30). La différenciation et la croissance du parasite dans les hépatocytes sont favorisées par la protéine Circumsporozoïte (31). Les mérozoïtes se développent dans des vésicules dérivées des hépatocytes appelées mérosomes qui sortent intactes du foie, protégeant ainsi les mérozoïtes de la phagocytose par les cellules de Kupffer. Ces mérozoïtes sont finalement libérés dans la circulation sanguine au niveau des capillaires pulmonaires et déclenchent le stade sanguin de l'infection.

Au cours du paludisme à *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes appelées hypnozoïtes peuvent rester dormants pendant des mois dans le foie. Ces formes se transforment en schizontes après une période de latence, généralement de quelques semaines à quelques mois, provoquant des rechutes de l'infection clinique.

La phase pré-érythrocytaire dure en général 5 à 16 jours et varie selon les espèces parasitaires. En moyenne cette étape se déroule en 5 à 6 jours pour *P. falciparum*, 8 jours pour *P. vivax*, 9 jours pour *P. ovale*, 13 jours pour *P. malariae* et 8 à 9 jours pour *P. knowlesi*. L'étape pré-érythrocytaire reste une phase « silencieuse », avec peu de pathologie et aucun symptôme, car seulement quelques hépatocytes sont affectés. Cette phase possède également un cycle unique, contrairement au stade érythrocytaire suivant, qui se produit à plusieurs reprises.

1.1.3.2 Le stade érythrocytaire

La deuxième étape de la phase asexuée qui se déroule chez l'homme est l'étape érythrocytaire. Elle correspond à la schizogonie érythrocytaire qui est l'étape centrale dans le GR. Les mérozoïtes libérés par le foie après reconnaissance et fixation, pénètrent dans les GRs en moins de 60 secondes. Cette disparition rapide de la circulation diminue l'exposition des antigènes à la surface du mérozoïte, protégeant ainsi ces formes parasitaires de la réponse immunitaire de l'hôte (27). L'invasion des GRs par les mérozoïtes est facilitée par les interactions moléculaires entre différents ligands présents sur le mérozoïte et les récepteurs de l'hôte sur la membrane érythrocytaire. Ainsi, le processus d'attachement, d'invasion et d'établissement du mérozoïte dans les GRs est rendu possible par les organites sécrétoires apicaux spécialisés du mérozoïte, appelés micronèmes, rhoptries et granules denses (32). Par ailleurs, l'interaction entre le parasite et les GRs stimule une « vague » rapide de déformation à travers la membrane des GRs, conduisant à la formation d'une jonction parasite-cellule hôte stable. Le parasite se fraye ensuite un chemin à travers la bicouche érythrocytaire à l'aide du complexe actine – myosine, des protéines TRAP et de l'aldolase, et crée une vacuole parasitophore pour s'isoler du cytoplasme de la cellule hôte, créant ainsi un environnement propice à son développement au sein des GRs. À ce stade, le parasite apparaît comme un « anneau » intracellulaire (33). Au sein des GRs, le nombre de parasites augmente rapidement avec un cycle soutenu de la population de parasites. Des cycles de développement parasitaire répétés se produisent avec une périodicité précise, et à la fin de chaque cycle, des centaines de mérozoïtes sont nouvellement libérés et envahissent un plus grand nombre de GRs. Le cycle érythrocytaire se produit toutes les 24 heures pour *P. knowlesi*, 48 h *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* et 72 h *P. malariae*. Au cours d'un cycle, chaque mérozoïte croît et se divise dans la vacuole en 8–32 nouveaux mérozoïtes (en moyenne 10), à travers les stades de l'anneau, du trophozoïte et du schizonte. À la fin du cycle, les GRs infectés se rompent, libérant les nouveaux mérozoïtes qui à leur tour infectent plus de GRs. Le nombre de parasites peut atteindre rapidement des niveaux très élevés 10^{13} par hôte (34).

Une faible proportion de parasites asexués ne subit pas de schizogonie mais se différencie en gamétocytes au stade sexuel. Ces gamétocytes mâles ou femelles sont extracellulaires et non pathogènes et sont transmis à d'autres individus par le biais des anophèles femelles, au sein desquels ils continuent la phase sexuelle du cycle de vie du parasite. Les gamétocytes de *P. vivax* se développent peu de temps après la libération des mérozoïtes par le foie, alors que dans le cas de *P. falciparum*, les gamétocytes se développent beaucoup plus tard, les pics de densité des stades sexuels se produisant généralement 1 semaine après les pics de densité des stades asexués (35).

1.1.3.3 Le stade sexué

La phase sexuée du cycle du *Plasmodium* ou sporogonie a lieu chez le moustique son hôte définitif. Au cours d'un repas sanguin, l'anophèle femelle absorbe les gamétocytes mâles et femelles du *Plasmodium* chez un individu infecté. Des changements moléculaires et cellulaires dans les gamétocytes aident le parasite à s'adapter rapidement à son hôte pour initier le cycle sporogonique. Les gamètes mâles et femelles migrent dans l'intestin du moustique où ils fusionnent formant des zygotes, qui se différencient en ookinètes très mobiles qui s'enfouissent dans la paroi intestinale du moustique pour se transformer en oocystes. La croissance et la division de chaque oocyste produisent des milliers de formes haploïdes actives appelées sporozoïtes. Après la phase sporogonique de 8 à 15 jours, l'oocyste éclate et libère des sporozoïtes dans la cavité corporelle du moustique, d'où ils migrent et envahissent les glandes salivaires du moustique. Lorsque le moustique ainsi chargé de sporozoïtes prend un autre repas sanguin, les sporozoïtes sont injectés de ses glandes salivaires dans la circulation sanguine humaine, provoquant une infection paludéenne chez l'hôte humain. Il a été constaté que le moustique infecté et le parasite se profitent mutuellement et favorisent ainsi la transmission de l'infection. Les moustiques infectés par *Plasmodium* ont une meilleure survie et montrent un taux accru d'alimentation sanguine, en particulier à partir d'un hôte infecté (36).

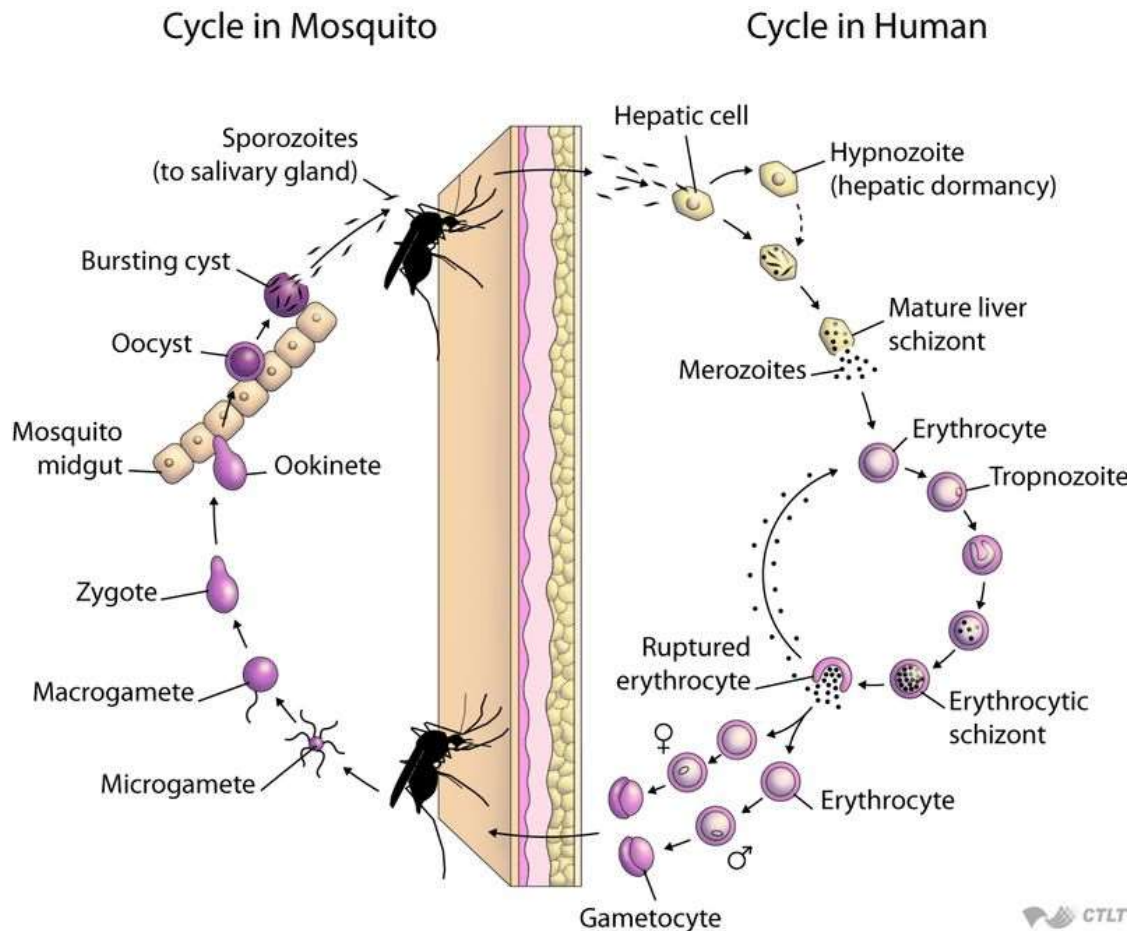


Figure 3 : Cycle de vie du *Plasmodium* (24).

1.2 La physiopathologie du paludisme

Les manifestations du paludisme sont dues à l'invasion des GRs par les formes asexuées du *Plasmodium* faisant du paludisme une maladie potentiellement multi systémique (34).

Chez les hôtes non immuns, *P. falciparum* se multiplie rapidement par libération de plusieurs mérozoïtes dans la circulation sanguine toutes les 48 heures (37). Certains mérozoïtes libérés envahissent les GRs et les autres meurent, devenant probablement la cible des macrophages et des cellules dendritiques. Toutefois, à la fin de la schizogonie dans les GRs, les mérozoïtes nouvellement formés sont libérés après éclatement des GRs avec de nombreux débris, tels que les dérivés de la membrane des GRs, l'hémozoïne et d'autres facteurs toxiques tels que le glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ces produits, en particulier le GPI, activent les macrophages et les cellules endothéliales pour sécréter des cytokines et des médiateurs inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale, l'interféron- γ , l'interleukine-1, l'IL-6, l'IL-8, le facteur de stimulation des colonies de macrophages et la lymphotoxine, ainsi que le superoxyde et l'oxyde nitrique (NO). De nombreuses études ont associé le motif GPI, commun

à plusieurs protéines de surface des mérozoïtes telles que MSP-1, MSP-2 et MSP-4, à une toxine parasitaire importante (38). A ce stade, les parasites se développent de manière synchrone en s'adaptant au rythme quotidien de la production systémique de TNF- α et au taux de glucose dans le sang (39). Ce déclenchement périodique de fortes réponses inflammatoires dans une étroite fenêtre de temps après chaque cycle cellulaire érythrocytaire est responsable de la périodicité caractéristique des paroxysmes du paludisme. Les manifestations systémiques du paludisme telles que céphalées, fièvre, nausées et vomissements, diarrhée, anorexie, fatigue, douleurs musculaires et articulaires, thrombocytopenie, immunosuppression, coagulopathie et manifestations du système nerveux central ont été largement attribuées aux diverses cytokines libérées en réponse aux dérivés de la membrane du parasite et des GRs (40).

En plus de ces facteurs, l'ADN plasmodial constitue également un facteur pro-inflammatoire pouvant induire une cytokinémie et la fièvre tel que décrit sur la **Figure 4**. En effet, l'ADN plasmodial est présenté par l'hémozoïne (produite pendant le développement du parasite au sein des GRs) et interagit à l'intérieur de la cellule avec le récepteur TLR-9 (Toll-like receptor-9). Ceci entraîne la synthèse de cytokines pro-inflammatoires qui augmentent la libération des prostaglandines à l'origine de l'induction de la fièvre (41). Cependant, l'hémozoïne a également été liée à l'induction de l'apoptose au cours du développement de cellules érythroïdes dans la moelle osseuse, contribuant à la survenue d'une anémie (42).

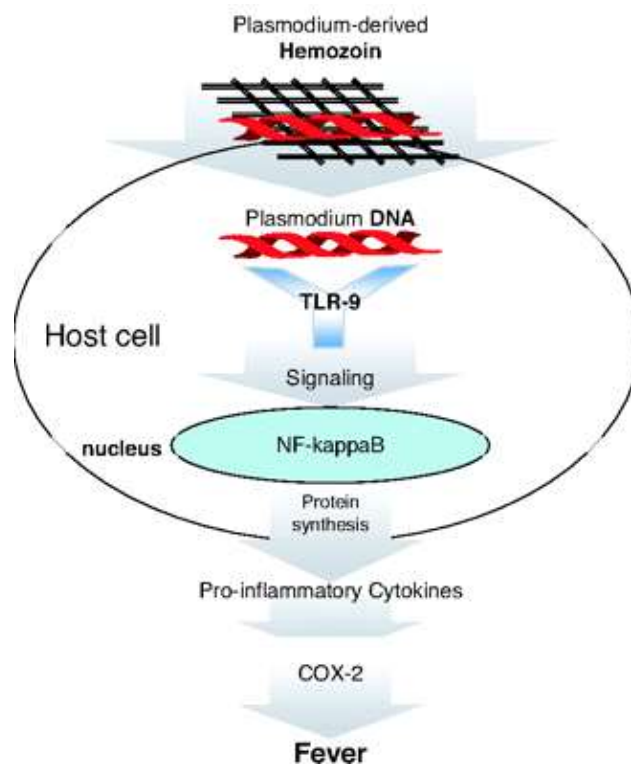


Figure 4. Mécanisme d'induction de la fièvre. Adapté de Anju et *al.*, 2014 (43).

Par ailleurs, l'infection des GRs par le *Plasmodium*, en particulier *P. falciparum*, entraîne d'importantes modifications structurelles, biochimiques et mécaniques progressives des GRs qui peuvent entraîner des complications mortelles. Plusieurs facteurs physiopathologiques tels que la biomasse parasitaire, les toxines parasitaires et la réponse inflammatoire, la cytoadhérence, le *rosetting* et la séquestration, l'altération de la déformabilité et de la fragilité des GRi, l'activation, le dysfonctionnement et les dommages de l'endothélium, et une altération de la thrombostase ont été associés au développement du paludisme grave (44) (**Figure 5**).

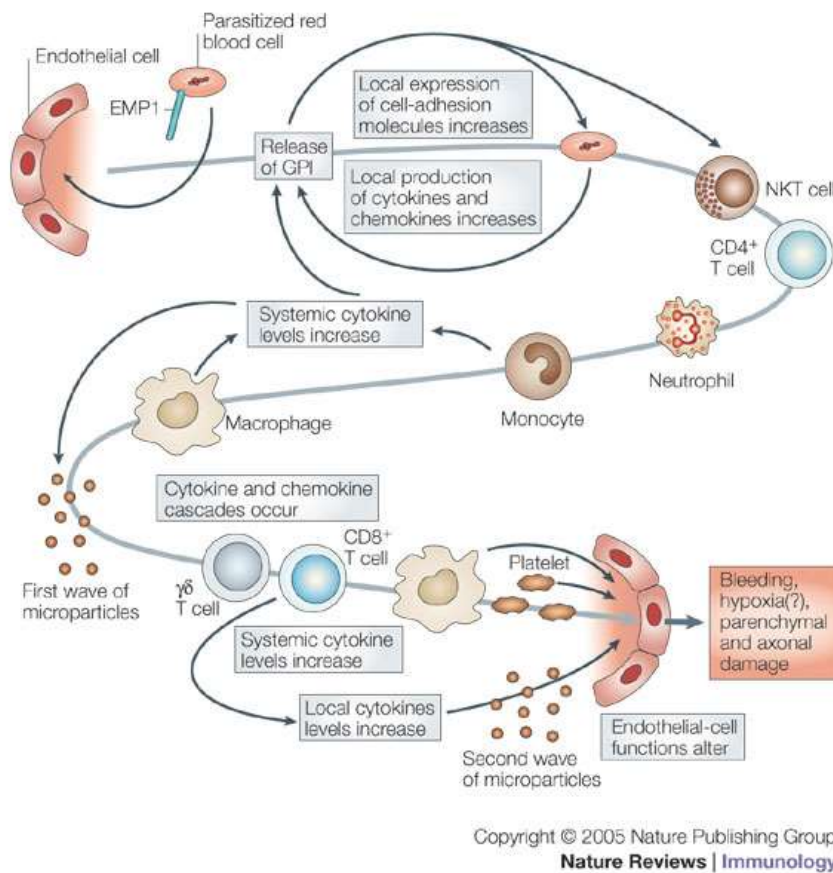


Figure 5 : Représentation schématique de la physiopathologie du paludisme grave (45).

1.2.1 La cytoadhérence, la séquestration et le rosetting

Les GRs infectés par les stades tardifs de *P. falciparum* adhèrent à l'endothélium veineux capillaire et postcapillaire des micro-vaisseaux (cytoadhérence) par des interactions entre leurs protéines membranaires et les molécules d'adhésion cellulaires exprimées à la surface des cellules endothéliales. Ces GRi adhèrent également aux GRs non infectés, entraînant la formation de rosettes de GRs (*rosetting*). La cytoadhérence provoque la séquestration des parasites dans divers organes tels que le cœur, les poumons, le cerveau, le

foie, les reins, les intestins, le tissu adipeux, les tissus sous-cutanés et le placenta. De plus, la séquestration de *P. falciparum* en croissance dans ces tissus profonds favorise leur maturation dans un environnement microaéroophile propice. De même, l'adhésion à l'endothélium leur permet d'échapper à la clairance de la rate et aux réactions du système immunitaire. Il se produit également une agrégation des plaquettes et des GRi (*clumping*) ainsi qu'une déformabilité des GRs. Cependant, la persistance de ces événements dans les organes vitaux entraîne une obstruction vasculaire aboutissant à un défaut de perfusion des tissus, limitant l'approvisionnement local en oxygène. Il se crée un environnement local toxique avec accumulation des déchets parasitaires. Ce phénomène entrave la synthèse de l'ATP mitochondrial et le relargage de toxines et de facteurs parasitaires favorisant le recrutement de leucocytes et de plaquettes. Ces cellules produisent des cytokines inflammatoires qui peuvent avoir un effet local ou systémique délétère et sont responsables de l'activation des cellules endothéliales (38,44,46,47). Les conséquences de cette activation sont l'altération de l'homéostasie, l'apoptose des cellules endothéliales, la rupture de la barrière hémato-encéphalique avec apparition d'événements neuropathologies secondaires au niveau du parenchyme cérébral tels que l'œdème cérébral ou le coma. Ces phénomènes sont plus intenses et fréquemment retrouvés au cours de l'infection à *P. falciparum* (44,46) (**Figure 6**).

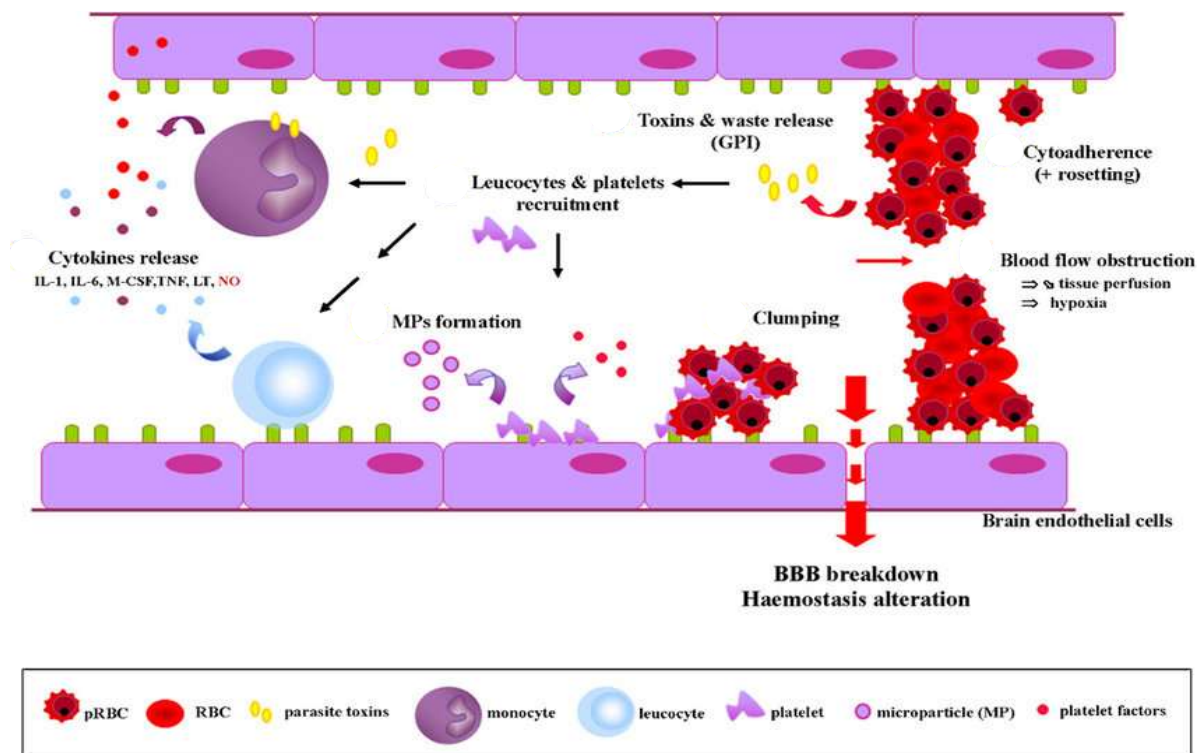


Figure 6 : Pathogenèse du neuro-paludisme au niveau de l'endothélium cérébral. Adapté de Gay *et al.*, Revue Neurologique. 2012 (48).

Certaines protéines exprimées à la surface des GRi assurent leur adhésion à l'endothélium et aux GRs non infectés. La plus importante de ces protéines est la protéine membranaire érythrocytaire de *P. falciparum* 1 (*PfEMP1*). *PfEMP1* apparaît à la surface des *pfGRi* environ 16 heures après l'invasion et annonce la cytoadhérence (44,49). *PfEMP1* peut se lier à plusieurs récepteurs d'adhésion exprimés sur les cellules endothéliales comme la thrombospondine, CD36, EPCR (Endothelial protein C receptor), ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire 1), molécule d'adhésion aux cellules vasculaires 1, CD31, molécule d'adhésion aux cellules neurales, sélectine P et sélectine E, intégrine $\alpha\beta3$, chondroïtine sulfate A (CSA) et l'hémagglutinine (46,47,50) (**Figure 7**). ICAM-1 et CD36 sont les récepteurs les plus fréquemment utilisés alors que CSA constitue le récepteur d'adhésion au placenta. Les différences de liaison aux récepteurs CD36 et ICAM-1

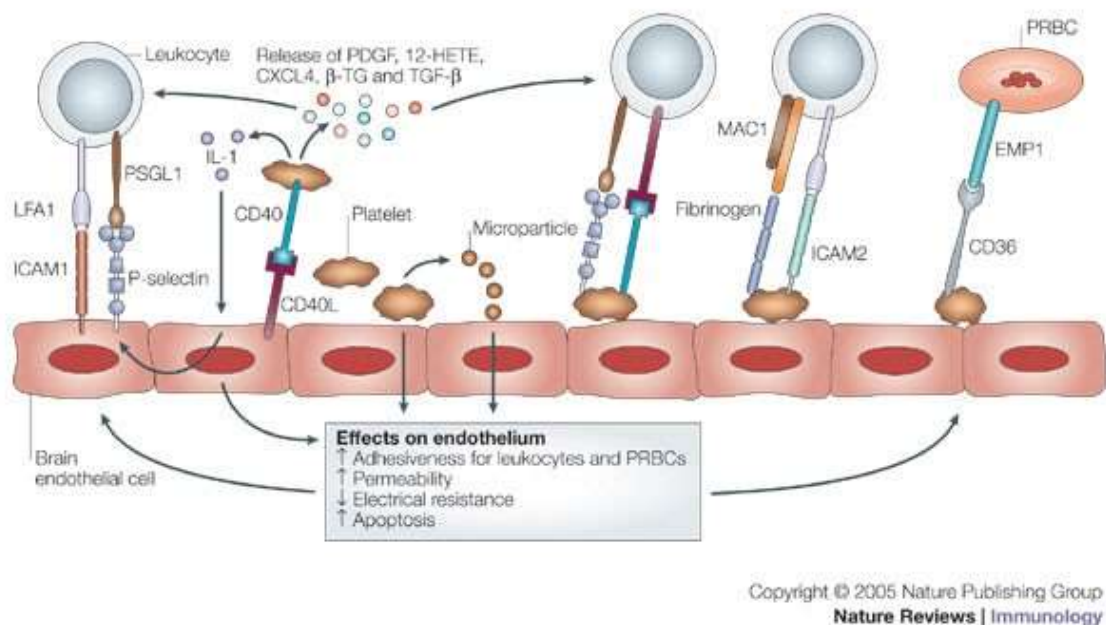


Figure 7 : Schéma représentatif des interactions au cours du neuropaludisme (45).

Les plaquettes, après activation par le facteur de nécrose tumorale, peuvent altérer sensiblement les fonctions des cellules endothéliales cérébrales, soit directement, en se liant à l'endothélium, soit indirectement, en libérant des molécules de leurs granules sécrétoires. Les plaquettes libèrent de l'interleukine-1 (IL-1) qui augmente l'expression des molécules d'adhésion ICAM1 et la production de cytokines (comme l'IL-6) par les cellules endothéliales. Les microparticules dérivées des plaquettes modifient également le métabolisme des cellules endothéliales en régulant la production de cyclooxygénase-2 et de prostaglandines, entraînant une perturbation de la perméabilité et de la résistance et l'apoptose de l'endothélium. L'adhésion des plaquettes activées à l'endothélium augmente l'expression des récepteurs à la surface des cellules

endothéliales pour l'adhésion des leucocytes, qui se lient aux molécules de surface des plaquettes telles que la sélectine plaquettaire (P-sélectine) et CD40L, respectivement via le ligand 1 de la glycoprotéine P-sélectine (PSGL1) et CD40. Par ailleurs, les microparticules dérivées des plaquettes peuvent augmenter l'adhésion des cellules endothéliales aux leucocytes et des plaquettes elles-mêmes à l'endothélium. Enfin, les plaquettes activées peuvent altérer indirectement les cellules endothéliales par action du contenu de leurs granules sur les leucocytes. Il s'agit du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), l'acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque (12-HETE), le ligand-4 de la chimiokine CXC (CXCL4 ou PF4), la β -thromboglobuline (β -TG) et le facteur de croissance transforming growth factor (TGF- β). EMP1, protéine de membrane érythrocytaire 1 de *Plasmodium falciparum* ; LFA1, antigène 1 associé à la fonction lymphocytaire ; MAC1, récepteur 1 des macrophages ; PRBC, globule rouge parasité peuvent déterminer la virulence des isolats de *P. falciparum* de différentes parties du monde (44,51). Le *rosetting* est médiée par la liaison de PfEMP1-DBL α au récepteur 1 du complément (CR1), CD31 et aux glycosaminoglycanes des GRs non infectés (51,52).

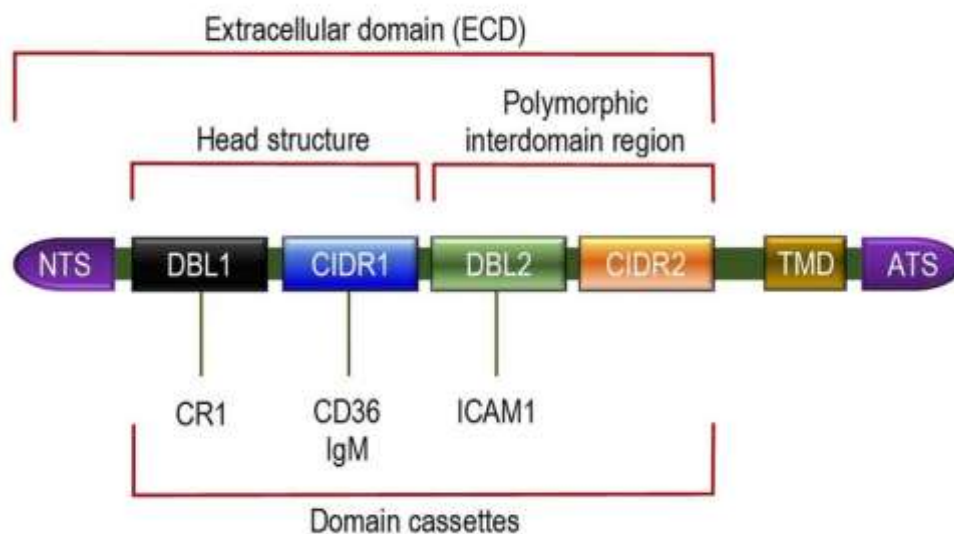


Figure 8 : Typical structure of *PfPEMP1* (53).

NTS = N terminal segment. TMD = transmembrane domain. ATS = intracellular acidic terminal segment.

1.2.2 Facteurs de susceptibilité ou de résistance

Certains facteurs peuvent influencer la susceptibilité ou la résistance à une infection palustre. Ces facteurs dépendent à la fois de l'hôte et du parasite. Il s'agit de :

- L'immunité de l'hôte. Les adultes qui ont toujours vécu dans une zone endémique sont moins susceptibles d'être atteints d'une forme grave que les adultes qui visitent une région

endémique pour la première fois et les jeunes enfants qui vivent dans la même zone d'endémie. Par ailleurs, les infections très précoces, survenant durant les trois premiers mois de la vie, lorsque les anticorps maternels protègent encore le nourrisson contre la multiplication des parasites ou de la maladie, peuvent conférer une protection partielle, réduisant le risque de développer une maladie grave (21). D'autres facteurs tels que l'hémoglobine fœtale, les composants anti-infectieux du lait maternel peuvent également contribuer à la clairance des parasites.

- La grossesse, surtout les primigestes qui sont susceptibles de développer le paludisme avec de graves conséquences (54).
- Des différences génétiques chez l'hôte humain. Certaines pathologies génétiques héréditaires telles que le trait drépanocytaire (HbS, HbC), les α et la β -thalassémie et un déficit en G6PD qui confèrent une résistance contre les formes compliquées ou graves du paludisme (55–57).
- Des antigènes exprimés à la surface du globule rouge. Il est constaté que la formation de rosettes est moindre chez les individus de groupe sanguin O par rapport aux groupes A, B et AB. Les patients du groupe sanguin O peuvent ainsi être protégés contre le paludisme grave (58). Par ailleurs, *P. vivax* envahit uniquement les GRs exprimant l'antigène Duffy, en utilisant la protéine de liaison à l'antigène Duffy et la protéine d'homologie des réticulocytes. *P. falciparum* utilise plusieurs familles de récepteurs différentes et des voies d'invasion alternatives qui sont très redondantes. En effet, *P. falciparum* possède quatre gènes de protéine de liaison aux érythrocytes de type Duffy, par rapport à un seul gène de la famille DBL-EBP de *P. vivax*, permettant au *P. falciparum* d'envahir tout globule rouge (59,60).

1.3 Les aspects cliniques

1.3.1 L'accès palustre simple ou paludisme non compliqué

Il est défini par la présence des symptômes de paludisme associé à un test de diagnostic parasitologique positif (par microscopie ou test de diagnostic rapide) et l'absence de signe de gravité (61).

1.3.1.1 L'accès palustre de primo-invasion

C'est la forme clinique la plus souvent observée chez le sujet neuf, non immun, les voyageurs en zone non endémique. En zone d'endémie, cet accès est observé chez les jeunes enfants (62). Cet accès est caractérisé par une période d'incubation qui correspond à la durée

de la phase hépatocyttaire (6 jours pour *P. falciparum*) et qui est totalement asymptomatique. Elle est marquée par l'apparition d'une fièvre brutale, continue, souvent accompagnée d'un malaise général avec myalgies, céphalées, et parfois des troubles digestifs (anorexie, douleurs abdominales, nausées, vomissements et même parfois la diarrhée) : On parle « d'embarras gastrique fébrile ». L'examen clinique à ce stade est souvent normal, le foie et la rate ne sont pas palpables. Ultérieurement, le foie peut augmenter de volume et devenir un peu douloureux, la rate devient palpable au bout de quelques jours, les urines sont rares, foncées et peuvent contenir des protéines. On observe parfois des éruptions d'herpes labial (63,64).

1.3.1.2 L'accès palustre à fièvre périodique

Il correspond à la description de la triade classique de l'accès palustre « frissons, chaleur, sueurs » survenant tous les 2 ou 3 jours. Cette triade est observée de manière typique dans les infections à *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, à la suite d'un accès de primo invasion non traitée, mais peut survenir longtemps après l'épisode fébrile initial (63). L'accès palustre à fièvre périodique est souvent précédé d'une phase prodromique, toujours identique chez un même patient, associant lassitude et troubles digestifs. Il débute classiquement le soir et dure une dizaine d'heures, associant successivement :

- Le stade de frissons : Il correspond à de violents frissons, une température élevée, l'augmentation du volume de la rate et une diminution de la tension artérielle. Cette phase dure environ une heure.
- Le stade de chaleur : Caractérisé par une température qui peut dépasser 40°C, cette phase s'accompagne de céphalées et de douleurs abdominales et une diminution du volume de la rate. Elle dure 3 à 4 heures.
- Le stade de sueurs : Il correspond à des sueurs profuses avec émission des urines foncées et l'effondrement brutal de la température. Ce stade dure 2 à 4 heures et s'accompagne d'une sensation de bien-être et d'euphorie, concluant la crise. Cette crise typique correspond à la schizogonie érythrocytaire et est donc fonction de l'espèce.

Toutefois, quelle que soit l'espèce en cause, la répétition des accès s'accompagne d'une anémie et d'une splénomégalie progressivement croissantes. Cela explique que tout paludisme, même du a une espèce autre que *P. falciparum* , peut à terme avoir des répercussions graves, notamment chez les enfants (63,64).

1.3.2 L'accès palustre grave

Le paludisme grave est défini comme un paludisme présentant au moins l'un des critères de gravité clinique ou biologique tels que définis par l'OMS (**Tableau 2**), associé à la présence de formes asexuées du parasite dans le sang et en dehors d'une cause alternative identifiée (61,65).

Le paludisme à *P. falciparum* du sujet non immun est potentiellement mortel. Le décès, quand il survient, est secondaire à la défaillance aiguë d'une ou de plusieurs grandes fonctions. Un paludisme grave peut prendre différentes formes cliniques dont la plus importante est l'atteinte cérébrale (66).

Tableau 2. Critères de gravité du paludisme chez l'adulte et l'enfant d'après l'OMS 2014(65).

Valeur Pronostic (+ à +++)		Manifestations cliniques	Fréquence	
Enfant	Adulte		Enfant	Adulte
+++	+++	Trouble de la conscience	+++	++
+++	+++	Détresse respiratoire	+++	++
+	++	Convulsions multiples	+++	+
+	+	Prostration	+++	++
+++	+++	Etat de choc	+	+
+++	+++	Œdème pulmonaire	+/-*	+
+++	++	Saignement anormal	+/-*	+
++	+	Ictère	+	+++
Signes biologiques				
+	+	Anémie sévère	+++	+
+++	+++	Hypoglycémie	+++	++
+++	+++	Acidose métabolique	+++	++
+++	+++	Hyperlactatémie	+++	++
++	++	Insuffisance rénale aiguë	+	++
+/-	++	Hyperparasitémie	++	+

* Rare

1.3.2.1 L'accès pernicieux ou le neuropaludisme

Il regroupe toutes les manifestations neurologiques, conséquence de l'atteinte cérébrale au cours de l'accès palustre : troubles de la conscience, prostration et convulsions. Au début, l'accès pernicieux est progressif et marqué par l'installation d'une fièvre irrégulière, d'un syndrome algique diffus, associé à des troubles digestifs. Le neuropaludisme à début brutal se traduit par une triade symptomatique (fièvre, coma, convulsions) à laquelle s'ajoute fréquemment une détresse respiratoire. Il est fréquent chez le jeune enfant en zone d'endémie (< 5 ans) et peut entraîner la mort en quelques heures.

A la phase d'état, le tableau clinique se complète avec une fièvre très élevée, des troubles de la conscience, des convulsions et des troubles du tonus. D'autres manifestations viscérales ou défaillances multiviscérales pouvant atteindre tous les organes, notamment les reins, les poumons, le foie peuvent être associées. Ainsi, on observe parfois une anémie grave (chez l'enfant) ou une insuffisance rénale aiguë (chez l'adulte) sans signe neurologique évident (50,67).

1.3.2.2 Les autres complications

Elles sont la conséquence d'infestations chroniques et peuvent être observées en zone d'endémie ou, en Europe, chez des migrants ayant vécu de nombreuses années en zone d'endémie et ayant souvent pratiqué une automédication insuffisante.

- **Le paludisme viscéral évolutif**

Il s'agit d'une manifestation chronique atteignant préférentiellement l'enfant vivant en zone d'endémie ou l'adulte non prémuni, soumis à des inoculations parasitaires répétées. Il est caractérisé par une anémie et une splénomégalie importante avec une fébricule et chez l'enfant, un retard staturopondéral. On observe également une très faible parasitémie et un taux d'anticorps classiquement moins élevé qu'en présence d'une splénomégalie palustre (68).

- **La splénomégalie palustre hyper-réactive**

Elle s'observe chez l'adulte vivant en zone impaludée. Il s'agit d'une maladie à complexes immuns, provoquée par une réponse démesurée de la rate à la stimulation prolongée des phagocytes mononuclés par des complexes immuns circulants. Il en résulte une splénomégalie avec hypersplénisme entraînant une chute des 3 lignées sanguines et une production d'IgG et IgM en quantité exagérée (69).

1.4 Le diagnostic biologique du paludisme

Il permet d'une part l'identification du parasite et d'autre part la confirmation du diagnostic du paludisme en plus des signes d'orientation. L'OMS recommande un diagnostic rapide au moyen d'un examen microscopique ou d'un test de diagnostic rapide (TDR) chez tous les patients dont on suppose qu'ils sont atteints de paludisme, avant d'administrer le traitement. Ces tests améliorent la prise en charge des patients présentant une affection fébrile et peuvent contribuer à limiter l'apparition ou la propagation d'une résistance aux antipaludiques en réservant ceux-ci aux sujets véritablement atteints de paludisme.

De nombreuses techniques permettent la mise en évidence des hématozoaires du paludisme. Les formes visibles du parasite chez l'homme étant intra-érythrocytaires, la microscopie constitue la technique de référence (70).

1.4.1 Les techniques microscopiques

1.4.1.1 Le frottis sanguin

Il s'agit de la seule technique qui permet à la fois de détecter la présence du parasite, de calculer la charge parasitaire et de déterminer de façon aisée l'espèce de *Plasmodium*. L'identification repose sur la taille des hématies parasitées et les stades parasitaires. Le seuil de détection est d'environ 100 parasites/ μ l.

Le frottis sanguin est obtenu par étalement d'une goutte de sang sur lame, la fixation par le méthanol et la coloration au May Grünwald Giemsa (MGG), Wright ou Wright-Giemsa. Selon la coloration, il est possible de mettre en évidence les granulations de Schüffner (*P. vivax* et *P. ovale*), les taches de Maurer (*P. falciparum*) ou les pointillés de Ziemann (*P. malariae*) spécifiques d'espèce (64).

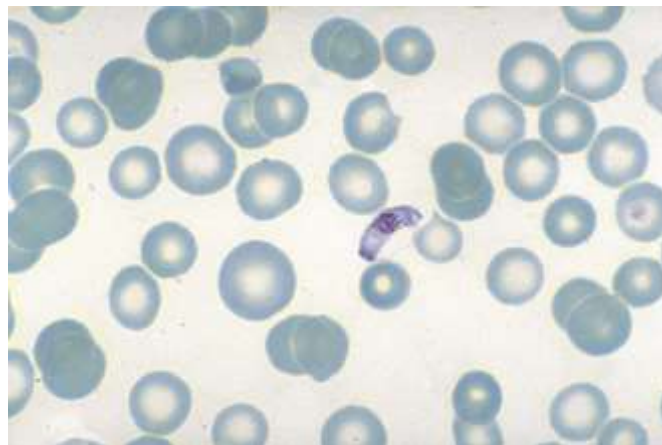


Figure 9 : Frottis sanguin coloré au MGG montrant un gamétocyte de *P. falciparum*.

1.4.1.2 Les techniques de concentration

- La goutte épaisse

Il s'agit d'une technique manuelle qui concentre les parasites sur une surface moins étendue que le frottis (effet de concentration) avec une coloration au Giemsa. Cette technique est plus longue et délicate à réaliser que le frottis sanguin, mais elle permet d'augmenter la quantité de sang examinée, améliorant ainsi la sensibilité analytique de l'examen lorsque la parasitémie est faible. L'aspect des parasites ne permet que difficilement d'effectuer le diagnostic d'espèce par cette méthode. Cent champs microscopiques (objectif à immersion, x 100) permettent de le réaliser avec un seuil de détection d'environ 10 à 20 parasites/ μ l(71).

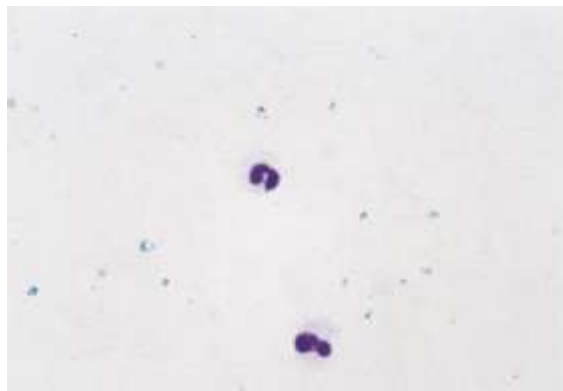


Figure 10 : Goutte épaisse colorée au MGG des trophozoïtes de *P. falciparum* et deux noyaux de globules blancs.

- Le Quantitative Buffy Coat (QBC) malaria test

C'est une technique de concentration qui colore à l'acridine orange l'acide désoxyribonucléique (ADN) des plasmodies à partir d'une goutte de sang prélevée sur capillaire spécifique. Les hématies parasitées sont concentrées au-dessus des hématies non parasitées. Après centrifugation avec concentration par gradient de densité, la lecture se fait au microscope avec éclairage halogène. Les trophozoïtes apparaissent sous forme de points verts fluorescents lorsqu'ils sont observés au microscope à ultraviolets (UV). Cette technique, rapide (10-15 minutes) et simple à mettre en œuvre, présente des performances analytiques similaires à la goutte épaisse, mais ne permet pas le diagnostic d'espèce. De plus, son coût reste élevé (72).

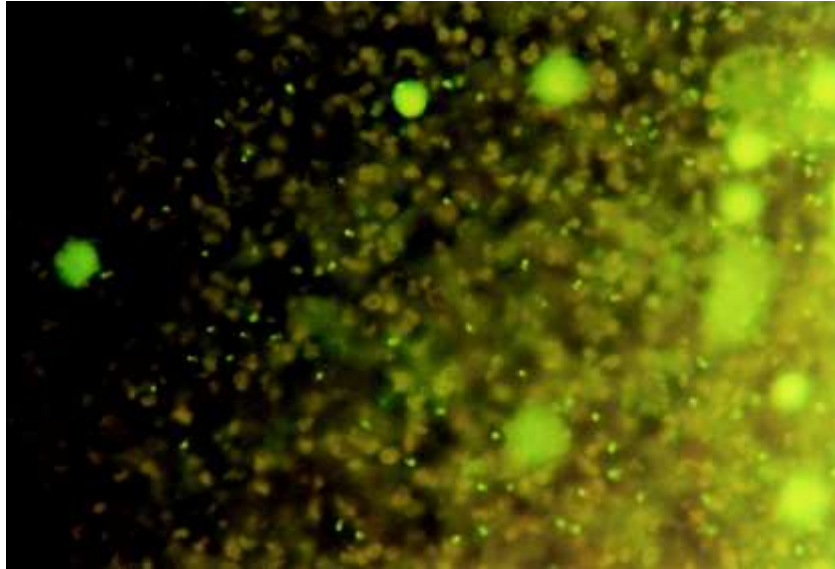


Figure 11 : Trophozoïtes de *P. falciparum* colorés à l’acridine orange par la méthode QBC (73).

1.4.2 La détection des protéines plasmodiales par immuno-chromatographie

Elle correspond aux tests de diagnostic rapide (TDR) qui détectent des protéines synthétisées soit par une seule espèce, soit par plusieurs espèces. Plusieurs antigènes différents peuvent être classiquement détectés sur une même bandelette. Les TDR se présentent sous forme de cassette, bandelette ou carte réactionnelle.

Le test est basé sur la détection des antigènes plasmodiaux libérés lors de l’éclatement des hématies contenus dans la goutte de sang infecté. Ces antigènes sont capturés en sandwich par liaison avec des anticorps monoclonaux d’origine animale spécifiques. Certains sont présents dans le tampon et marqués, tandis que d’autres fixés sur la nitrocellulose, lient le complexe immunitaire faisant apparaître une bande colorée (74). L’interprétation se réalise en 10 à 20 minutes (70).

1.4.2.1 Les protéines spécifiques d’espèce

Les protéines riches en histidine sont spécifiques de *P. falciparum*. Elles sont présentes dans la membrane et le cytoplasme du parasite mais peuvent aussi être secrétées et se retrouver dans le plasma (75). Elles sont produites uniquement par les formes asexuées et les gamétocytes jeunes de *P. falciparum* et associées à l’expression des “knobs” (protubérances de la membrane érythrocytaire impliquées dans la survenue de l’accès palustre grave) (76,77). La plus utilisée dans les TDR est *P. falciparum* Histidine Rich protein-2 (*PfHRP2*) exprimée par *P. falciparum*. Cependant, certaines souches de *P. falciparum* (notamment en Afrique, en Amazonie et au

Pérou), présentant une délétion du gène des protéines *PfHRP-2*, peuvent donner de faux négatifs (74). La sensibilité de ce TDR est de 100 parasites/ μ L (72).

1.4.2.2 Les protéines pan-plasmodiales

- L'aldolase plasmodiale

Située dans les membranes des stades schizontes, elle est commune aux cinq espèces de *Plasmodium*. Elle permet une bonne détection des *P. falciparum* et *P. vivax*. Cependant, sa sensibilité est plus faible vis-à-vis de *P. ovale* et *P. malariae* (76). Pour cela, certains fabricants utilisent une aldolase spécifique de *P. vivax*.

- La lactate déshydrogénase plasmodiale (pLDH)

Il s'agit d'une enzyme glycolytique synthétisée par les stades asexués et commune aux cinq espèces plasmodiales. Son activité est proportionnelle à la parasitémie, et sa clairance rapide rend possible le suivi post-thérapeutique. Certains tests ciblent une forme moléculaire spécifique de pLDH pour *P. falciparum* et *P. vivax* (70). Leur sensibilité pour la détection de *P. falciparum* et *P. vivax* serait de l'ordre de 100 à 300 parasites/ μ L, comparable à celle du frottis (78).

1.4.3 Les méthodes d'amplification génique

L'amplification génique représente la technique la plus sensible et la plus spécifique pour la recherche du paludisme (79). Cependant, les délais de rendu des résultats ne permettent pas de l'intégrer dans le cadre du diagnostic d'urgence. Mais d'autres techniques, Amplification isotherme induite par boucle (LAMP) et l'amplification de séquences d'acides nucléiques, permettent de réduire ce temps et de replacer ainsi la biologie moléculaire en première place dans le diagnostic du paludisme (70).

1.4.3.1 La réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Cette technique permet de détecter d'une part le genre *Plasmodium* grâce à des séquences communes conservées dans toutes les espèces et d'autre part d'une espèce donnée par une séquence spécifique. Elle a de très bonnes performances pour l'identification des espèces, surtout autres que *P. falciparum* (70). En effet, la PCR permet de gagner de 1 à 2 log₁₀ par rapport à la goutte épaisse ou au QBC[®] Malaria Test et son seuil de sensibilité est de 0,5 à 0,005 parasites/ μ L pour la détection de *P. falciparum* (80). Pour les trois autres espèces plasmodiales, la PCR apparaît plus sensible que les techniques microscopiques, mais les

données bibliographiques restent parcellaires (72). Son apport essentiel est sa valeur prédictive négative élevée, ainsi que la détection de très faibles charges parasitaires ou d'infections mixtes comportant plusieurs espèces, difficilement détectables en microscopie. L'identification sans ambiguïté de chaque espèce permet une prise en charge adaptée, notamment pour la prévention des reviviscences à *P. ovale* ou *P. vivax* (70).

Les techniques de PCR utilisées pour le diagnostic du paludisme sont la PCR par amorces incluses en une étape, la PCR multiplexe et la PCR quantitative. L'amplification moléculaire de la petite sous-unité 18S de l'ARN ribosomique (ARNr 18S), avec une technique de PCR par amorces incluses, est la technique d'amplification génique la plus utilisée dans la recherche sur le diagnostic du paludisme. La PCR quantitative en temps réel et l'amplification de séquences d'acides nucléiques peuvent elles aussi servir à déterminer la densité parasitaire⁶⁴.

1.4.3.2 L'amplification isotherme induite par boucle (LAMP)

Cette technique rapide à mettre en œuvre (environ 40 minutes) et avec une sensibilité égale à la PCR, la technique LAMP a pour véritable avantage sa très bonne valeur prédictive négative (proche de 100 %). Néanmoins, un résultat positif n'affirme que la présence d'hématozoaires du genre *Plasmodium*, sans préciser l'espèce. Le cas échéant, il faut donc la compléter par des méthodes permettant le diagnostic d'espèce et la quantification de la parasitémie (70).

1.4.4 Les méthodes sérologiques

Le diagnostic du paludisme à l'aide de méthodes sérologiques est généralement basé sur la détection d'anticorps contre les formes asexuées du parasite. Le test d'immunofluorescence indirect (IFA) est un test sérologique utile dans les enquêtes épidémiologiques, pour le dépistage des donneurs de sang potentiels et dans les cas d'infection récente chez les sujets non-immuns (81). La validation de cette méthode a permis de détecter les anticorps spécifiques du *Plasmodium* dans diverses unités de banque de sang pour éviter ainsi le paludisme post-transfusionnel (81). Après une infection par le *Plasmodium*, des anticorps spécifiques sont produits dans les 2 semaines suivant l'infection initiale et persistent pendant 3 à 6 mois après l'élimination du parasite. Le principe de l'IFA est basé sur l'utilisation d'un antigène spécifique ou un antigène brut déposé sur une lame et maintenu à -30 °C jusqu'à utilisation pour quantifier les anticorps IgG et IgM dans les échantillons de sérum des patients. Des titres supérieurs à 1:20 sont généralement considérés comme positifs tandis que des titres inférieurs à 1:20 ne sont pas confirmés. Les titres supérieurs à 1:200 peuvent être classés comme infections récentes.

Cette technique n'est pas automatisée et nécessite une microscopie à fluorescence. Par ailleurs, le manque de standardisation des réactifs IFA rend cette technique peu pratique pour une utilisation de routine dans les centres de transfusion sanguine et pour harmoniser les résultats inter laboratoires (82).

De nouvelles techniques sérologiques immuno-enzymatiques ont par la suite été développées telles que l'ELISA pour suppléer l'immunofluorescence indirecte. Les techniques ELISA, contenant un ou plusieurs antigènes figurés spécifiques de *Plasmodium spp.*, ont démontré des performances équivalentes à l'immunofluorescence indirect dans certaines études (83).

1.5 Les moyens de lutte

1.5.1 La prévention

Une grande partie des efforts de lutte contre le paludisme s'est concentrée sur l'élaboration de stratégies de lutte anti-vectorielle. D'autres mécanismes de protection ciblent les groupes à haut risque tels que les femmes enceintes et les jeunes enfants (84).

1.5.1.1 La lutte anti-vectorielle

Elle englobe les mesures dirigées contre le moustique et permettent de limiter sa capacité à transmettre le *Plasmodium* en protégeant les zones connues pour être réceptives à la transmission(85). Elle vise donc à réduire la capacité vectorielle des populations locales de vecteurs en dessous du seuil critique nécessaire pour maintenir la transmission (86).

- Les moustiquaires imprégnées d'insecticide

Il s'agit des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée de vie (MILD), où l'insecticide dure jusqu'à 3 ans, et de moustiquaires traitées de manière conventionnelle, où l'insecticide est actif jusqu'à 12 mois. Selon les recommandations de l'OMS, les ministères de la santé et les organismes donateurs intensifient la distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticide, en particulier aux populations à risque élevé dont les jeunes enfants et les femmes enceintes en zone de forte endémie (87). 67 à 73% des cas de paludismes évités au cours de ces 15 dernières années sont attribués à la forte expansion de la distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticide (88).

Cependant, il a été estimé en 2016 que 47% de la population à risque de paludisme n'a pas utilisé de moustiquaire imprégnée (89). A cela s'ajoute, la résistance des moustiques

vecteurs *Anophèles* aux insecticides pyréthroïdes utilisés dans les moustiquaires imprégnées qui remettent en cause l'efficacité de ce moyen (90).

- **La pulvérisation intra-domiciliaire**

C'était la principale stratégie de la campagne mondiale d'éradication du paludisme. Elle a permis l'élimination du paludisme dans de nombreux pays et a considérablement réduit sa charge dans d'autres (91). En 2015, environ 106 millions de personnes étaient protégées grâce à cette stratégie. En général, elle était destinée aux zones à transmission faible et / ou saisonnière, et son expansion récente dans des zones à transmission élevée a été remise en question en raison de préoccupations concernant la durabilité à long terme (91).

En effet, la pulvérisation intra domiciliaire peut être très coûteuse s'il est utilisé à grande échelle dans les zones à forte transmission. De plus, cette technique présente des risques pour la santé humaine et l'environnement. C'est le cas de certains insecticides tels que le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) interdits par certains pays et qui ne sont recommandés par l'OMS que pour l'utilisation des conditions spécifiques. Cependant, la résistance aux insecticides (pyréthroïdes) constitue également un obstacle au recours à la pulvérisation intra domiciliaire (84).

- **La gestion des sources larvaires**

Elle concerne la gestion des habitats aquatiques qui sont les sites potentiels de reproduction des moustiques, pour empêcher l'achèvement du développement immature. C'est l'un des premiers moyens de lutte contre le paludisme qui connaît un nouvel essor avec la reconnaissance ces dernières années que les piqûres de moustiques à l'extérieur contribuent à la transmission du paludisme (92). il offre le double avantage de réduire le nombre de moustiques qui pénètrent dans la maison et ceux qui piquent à l'extérieur (93).

La gestion des sources larvaires associe plusieurs outils regroupés en 4 moyens principaux :

- **La modification de l'habitat** comprenant le changement permanent des terres et de l'eau, y compris l'aménagement paysager, le drainage des eaux de surface, la remise en état des terres et le remplissage (92,94).
- **La manipulation de l'habitat** impliquant des mesures telles que le rinçage, le dégagement des drains, l'ombrage ou l'exposition des habitats au soleil (84).

- **La lutte biologique** qui consiste à l'introduction d'ennemis naturels dans les habitats aquatiques tels que les poissons prédateurs, les invertébrés, les parasites ou les organismes pathogènes (94).
- **Les larvicides** par l'application régulière d'insecticides biologiques ou chimiques aux plans d'eau pour lutter contre les moustiques. Les larvicides microbiens sont efficaces dans la lutte contre les larves de moustiques *Anophèles* et la réduction de la densité des moustiques adultes. Par rapport aux larvicides chimiques, ils ne sont pas nocifs pour les autres espèces aquatiques.

Les autres méthodes de lutte anti-vectorielle

Il s'agit de moyens supplémentaires pour le contrôle du paludisme. Plusieurs stratégies en développement sont proposées. Elles comprennent :

- **L'amélioration des habitations** qui fait référence au filtrage complet ou à la fermeture d'ouvertures telles que les fenêtres, les portes et les avant-toits ou à l'installation de plafonds. L'objectif est de réduire le contact entre les moustiques et les humains à l'intérieur.
- **L'alimentation en sucres toxiques attractifs** qui tue les moustiques mâles et femelles en quête de sucre dans l'environnement extérieur. Les solutions sont pulvérisées sur la végétation ou suspendues dans de simples stations d'appâts.
- **L'administration massive de médicaments** à l'ensemble de la population dans une zone géographique avec une dose curative d'un médicament sans dépistage préalable de l'infection et indépendamment de la présence de symptômes (95). L'ivermectine, un endectocide est utilisé ici dans la prévention du paludisme résiduel. Le médicament, une fois administré, reste dans le sang pendant environ 6 jours et le rend toxique pour les moustiques qui piquent l'individu traité (96). Il a été également utilisé dans la lutte antivectorielle ciblant le bétail.

En effet, la plupart des espèces vectrices de paludisme présentent un comportement plus diversifié, se nourrissant aussi bien sur le bétail que sur des humains. Cependant, cette stratégie nécessite une administration répétée.

- **La pulvérisation des essaims d'accouplement des *Anophèles*** permettant la réduction de la densité des moustiques (97).
- **Les répulsifs spatiaux** qui contribuent à réduire la transmission du *Plasmodium* . Ils peuvent compléter l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (98).
- **La modification génétique des *Anophèles***, en les rendant incapables de se reproduire ou génétiquement résistants au *Plasmodium* , puis en les introduisant dans la population, a été

pendant de nombreuses années un sujet de discussion bien que cela semblait impossible. Cependant, de récents outils tels que la technique d'édition de gènes CRISPR / Cas9 rendent possible cette stratégie. Il existe cependant de nombreux défis éthiques et de sécurité à relever (99).

1.5.1.2 La prévention chez les groupes à risque élevé

En zone d'endémie palustre, les personnes les plus vulnérables devraient bénéficier d'un certain niveau de protection contre le paludisme. Il s'agit des femmes enceintes, des enfants de moins de cinq ans, les populations nomades et les visiteurs des pays d'endémie. En dehors des femmes enceintes, la chimioprophylaxie n'est plus actuellement utilisée pour les populations autochtones des zones d'endémie et y vivant en permanence. En revanche, elle doit être envisagée de manière systématique pour tout sujet non immun se rendant en zone impaludée (84).

L'objectif du traitement préventif est de prévenir le paludisme en maintenant les niveaux de médicaments thérapeutiques dans le sang pendant la période de risque le plus élevé. Le paludisme peut être évité en prenant des médicaments qui inhibent le développement (prophylaxie causale) au stade hépatique (pré-érythrocytaire) ou des médicaments qui tuent les stades sanguins asexués (prophylaxie suppressive). Les prophylactiques causales tels les associations atovaquone + proguanil, primaquine peuvent être arrêtées peu de temps après avoir quitté une zone endémique, tandis que les prophylactiques suppressives doivent être prises pendant au moins 4 semaines après avoir quitté la zone afin d'éliminer les parasites asexués émergeant du foie des semaines après l'exposition. Pour les voyageurs, la chimioprophylaxie est commencée avant d'entrer dans la zone endémique pour évaluer la tolérabilité et pour les médicaments lentement éliminés pour constituer des rations thérapeutiques concentriques. Le choix de la chimioprophylaxie dépend de la zone visitée (intensité de transmission et niveau de résistance aux antipaludiques), de la saison et du sujet concerné (âge, femme enceinte, mode de vie, antécédents médicaux, etc.) (61).

Dans la région subsaharienne de l'Afrique où la transmission du paludisme est très saisonnière l'OMS recommande une chimioprophylaxie du paludisme saisonnier. L'association amodiaquine / sulfadoxine – pyriméthamine (SP) est administrée en une dose mensuelle chez les enfants de moins de 6 ans pendant chaque saison de transmission (61,84). Cependant, dans les zones de transmission modérée à intense du paludisme en Afrique, où la SP est toujours efficace, l'OMS recommande un traitement préventif intermittent avec la SP aux nourrissons

(<12 mois) au moment des deuxième et troisième cycles de vaccination contre la Diphtérie-Tétanos-Coqueluche et la vaccination contre la rougeole (61).

1.5.1.3 Les vaccins antipaludiques

L'un des plus grands défis de la médecine a été la mise au point d'un vaccin efficace et sûr contre le paludisme malgré les progrès réalisés pour la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires associés à la protection. De nombreux efforts de recherche se sont concentrés sur quatre approches différentes de vaccin contre le paludisme : un vaccin de parasite entier, un vaccin vivant atténué, un vaccin génétiquement modifié et un vaccin à sous-unités. Cependant, aucun vaccin largement accepté n'a été développé à ce jour. De plus, l'augmentation de l'antigénicité et l'innocuité des vaccins constituent des défis majeurs pour la recherche.

Selon le cycle biologique de *P. falciparum* , les vaccins antipaludiques peuvent être regroupés en trois types (**Figure 12**) : les vaccins pré-érythrocytaires, vaccins du stade érythrocytaire et les vaccins bloquant la transmission.

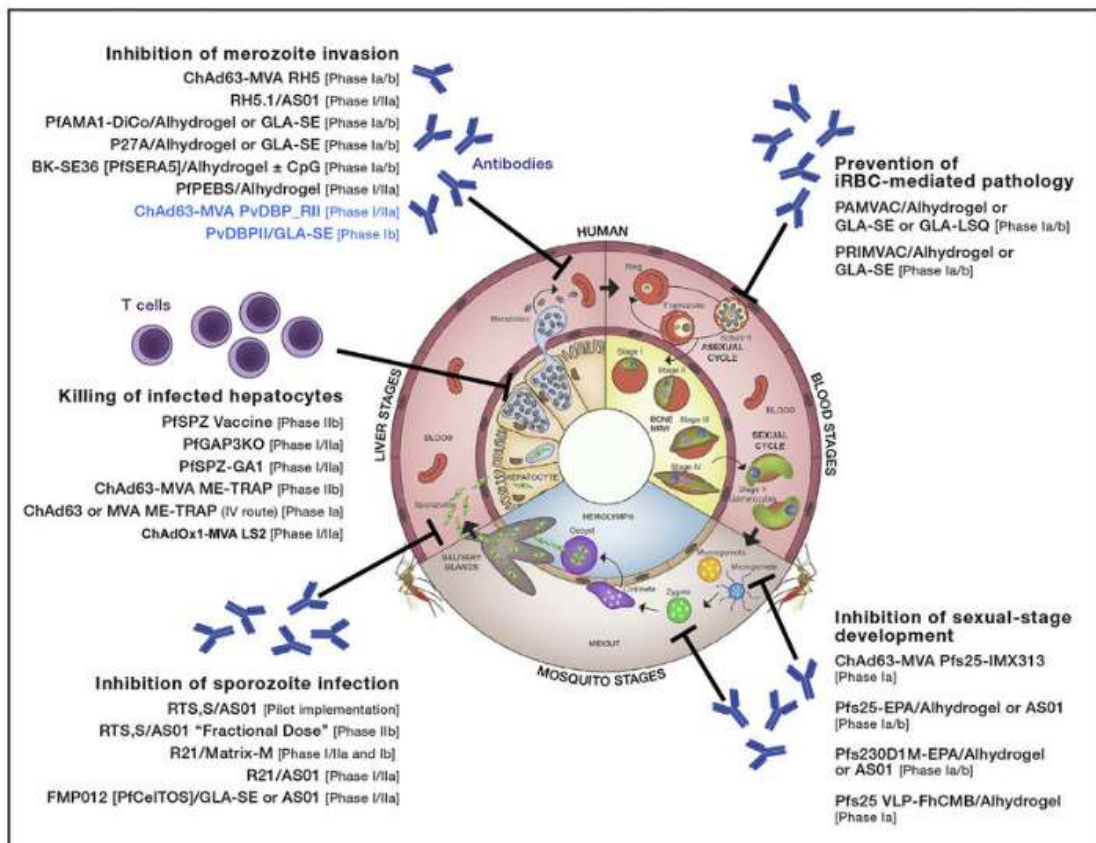


Figure 12 : Les candidats vaccins contre le paludisme en développement clinique (100,101).

1.5.1.3.1 Les vaccins pré-érythrocytaires

Également appelés vaccins anti-infectieux, les vaccins pré-érythrocytaire ciblent principalement les sporozoïtes de *P. falciparum* ou les cellules hépatiques infectées par le schizonte. Ils visent à prévenir l'infection en arrêtant la progression du stade hépatique. Ces vaccins sont destinés à induire d'une part des réponses anticorps contre les sporozoïtes empêchant leur entrée dans les hépatocytes. D'autre part, ces vaccins peuvent induire des lymphocytes T spécifiques des antigènes exprimés par les hépatocytes infectés. Ces lymphocytes T détruisent les hépatocytes infectés ou interfèrent avec le développement des parasites, empêchant ainsi la libération de mérozoïtes (102). Le vaccin pré-érythrocytaire doit être efficace à 99% pour interrompre les stades pré-érythrocytaires afin de fournir une immunité stérile aux individus non immuns. En effet, un seul sporozoïte échappant à l'immunité induite par le vaccin peut provoquer une infection entièrement pathogène au stade érythrocytaire, comme cela a été constaté lors des essais cliniques du dernier vaccin anti-sporozoïte RTS,S (103).

La plupart des recherches sur les vaccins contre le stade pré-érythrocytaire sont axées sur le développement de vaccins sous-unités contre les protéines parasitaires telles que la protéine circumsporozoïte de *P. falciparum* (*PfCSP*), la protéine d'adhésion associée à la thrombospondine (TRAP) et l'antigène du stade hépatique (LSA) (104).

1.5.1.3.1.1 La protéine circumsporozoïte de *P. falciparum* (*PfCSP*)

Située à la surface du sporozoïte mature, *PfCSP* joue un rôle important dans l'invasion des cellules hépatiques par les sporozoïtes (105). *PfCSP* a fait l'objet de nombreux essais basés sur une variété de peptides, de protéines recombinantes, de vecteurs viraux modifiés, de plasmides et d'une grande diversité d'adjuvants et de schémas d'immunisation (106).

Le vaccin **RTS,S / AS01** est le premier vaccin contre le paludisme introduit par l'OMS en phase pilote dans la vaccination de routine dans trois pays d'endémie palustre Ghana, Kenya et Malawi (107). Depuis Octobre 2021, l'OMS recommande son utilisation généralisée en routine chez les enfants en Afrique sub-saharienne et dans les régions où transmission du paludisme à *P. falciparum* est modérée ou forte (108). La désignation « RT » se réfère à environ 190 acides aminés de l'extrémité C-terminale et de la partie centrale répétée du *PfCSP*, et « S » se réfère à l'antigène de surface de l'hépatite B. La co-expression de la protéine RTS de fusion paludisme-hépatite B avec l'antigène S dans les cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) entraîne la formation de pseudo-particules RTS,S. L'adjuvant AS01 se compose de liposomes MPL-A et QS21. L'essai de phase III mené dans 7 pays d'Afrique subsaharienne a inclus 15460

enfants de deux tranches d'âge (6 à 12 semaines et 5 à 17 mois) ayant reçu trois doses à intervalle d'un mois, suivi d'une quatrième dose 18 mois plus tard. Chez les enfants de 5 à 17 mois, les résultats ont montré que le RTS,S ne protégeait que 39% et entraînait une réduction de 31,5% du paludisme grave chez ceux ayant reçu une quatrième dose (109). Cependant chez les enfants de 6 à 12 semaines, le vaccin RTS,S induisait une faible réponse immunitaire justifiant l'absence de recommandation d'usage par l'OMS pour cette tranche d'âge (107).

Par ailleurs, des événements indésirables graves, tels que les convulsions et la méningite étaient significativement plus observés chez les enfants vaccinés de 5 à 17 mois (109). Toutefois, le vaccin RTS,S est actuellement à une phase 4 consistant en une étude pilote d'implémentation en vue d'élaborer des recommandations relatives à l'usage en routine chez les enfants africains à large échelle (110).

1.5.1.3.1.2 La protéine d'adhésion associée à la thrombospondine (TRAP)

Également connue sous le nom de protéine de surface *Pf*SPZ-2 (SSP-2), TRAP est un antigène majeur qui joue un rôle important dans l'invasion des hépatocytes et des glandes salivaires des moustiques par les sporozoïtes (111). Cette protéine interagit directement avec les intégrines à la surface des cellules humaines (112). La fusion d'une chaîne multi-épitope (ME) à l'antigène TRAP de la souche *Pf*T9/96 et l'expression dans un vecteur, le virus Ankara modifié (MVA) et l'adénovirus simien 63 (ChAd63) a montré un effet protecteur après une primovaccination chez la souris et le macaque (113). De même après l'administration du vaccin ChAd63 MVA ME-TRAP, les réponses anti-TRAP IFN- γ chez les nourrissons étaient aussi élevées que chez les adultes. Les réponses IgG, principalement composées d'isotypes IgG1 et IgG3, étaient plus élevées après le rappel des vaccins (114).

1.5.1.3.1.3 L'antigène du stade hépatique (LSA)

LSA-1 est une protéine de 230 kDa dont la région centrale contient 86 répétitions d'une séquence de 17 acides aminés ou des variations mineures de celle-ci (115). LSA-1 est devenue un candidat vaccin intéressant du fait qu'elle induit une réponse immunitaire proche de celle observée lors de l'infection naturelle. De ce fait, plusieurs essais cliniques ont testé les effets des vaccins LSA-1 (116). Le LSA-NRC, un antigène contenant des épitopes de cellules T provenant des régions terminales N et C du LSA-1 et plusieurs répétitions centrales d'acides aminés, a été exprimé dans *Escherichia coli* et combiné avec l'AS01B ou l'AS02A pour induire des réponses immunitaires cellulaires spécifiques au LSA-1 (117). En plus du LSA-1, la protéine LSA-3 hautement conservée est un candidat vaccin sous-unitaire (118). En effet, un

vaccin contenant la protéine LSA-3 a induit une réponse antigène pré-érythrocytaire chez la majorité des individus de différents groupes d'âge (119). Cependant, sa sécurité, son immunogénicité et son efficacité n'ont pas été démontrées à ce jour (117).

1.5.1.3.1.4 Le sporozoïte entier de *P. falciparum* (PfSPZ)

L'efficacité des vaccins dirigés contre les sporozoïtes dépend leur capacité à les détruire avant qu'elles n'atteignent le foie ou pendant leur développement à ce niveau(104). Plusieurs méthodes d'obtention du vaccin PfSPZ ont été testées. Le vaccin PfSPZ atténué, obtenu par irradiation du parasite entier, induisait un niveau élevé d'IFN- γ et de cellules T CD8+ spécifiques du PfSPZ. En comparaison avec le PfSPZ inactivé par la chaleur, la fréquence des cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ était beaucoup plus élevée dans le vaccin PfSPZ atténué. De plus, un niveau élevé (plus de 90 %) de protection contre le paludisme chez l'homme n'a été atteint auparavant que par la vaccination avec des sporozoïtes (PfSPZ) de *P. falciparum* inoculés par des moustiques. Cependant, une autre stratégie de vaccination consistant en l'administration concomitante du vaccin PfSPZ avec une chimioprophylaxie (PfSPZ-CVac) à la chloroquine ou méfloquine semblait entraîner une protection similaire mais seulement 22 % (2 sur 9) des volontaires avait des cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ (120). En plus de l'atténuation par irradiation et de l'utilisation d'un médicament antipaludique, le vaccin PfSPZ a été également élaboré par 'knockout des gènes'. L'un des principaux candidats est le PfSPZ-GA1 dans lequel les deux protéines *Pfb9* et *Pfslarp* ont été éliminées, permettant l'infection du foie sans développement ultérieur. Toutefois, les essais cliniques portant sur les vaccins PfSPZ ont fourni des résultats d'efficacité prometteurs (120,121). Le maintien des niveaux d'anticorps et des réponses lymphocytes T spécifiques demeure un défi pour le développement du vaccin PfSPZ.

1.5.1.3.2 Les vaccins ciblant les stades sanguins asexués

Des signes cliniques, y compris la fièvre récurrente, peuvent apparaître après que le *Plasmodium* circule au stade sanguin dans les globules rouges du corps humain (**Figure 2**). La présence de ces stades (mérozoïte, anneau, trophozoïte, schizonte et gamétocyte) peut entraîner une pathologie sévère et même la mort. Après invasion des GRs humains à partir du foie, la protéine de surface du mérozoïte de *P. falciparum* peut rester dans les membranes des GRs et être exposée directement au système immunitaire de l'hôte. Cela peut stimuler les cellules T et les cellules B pour induire des réponses immunitaires.

1.5.1.3.2.1 La protéine 1 de surface du mérozoïte (MSP1)

MSP1 est situé à la surface du mérozoïte où il joue un rôle important dans l'invasion érythrocytaire. En effet, *PfMSP1* est hydrolysé en *PfMSP1₈₃*, *PfMSP1₂₈*, *Pfmsp1₃₈* et *Pfmsp1₄₂* avant l'invasion des érythrocytes. Des études *in vitro* ont montré que les mérozoïtes envahissent les GRs rapidement (<1 mn) n'exposant ainsi que certains antigènes pendant une fraction de seconde (122). Pendant l'invasion, le *PfMSP1₄₂* est transformé en *MSP1₃₃* et *MSP1₁₉* (123). L'immunisation de la souris avec le vaccin chimérique *rPfMSP1/8* obtenu par fusion de la protéine recombinante *PfMSP1₁₉* avec la région N terminale de la protéine *rPfMSP8* (*PfMSP8* déficient en domaine riche en asparagine/acide aspartique), induisait de fortes réponses des lymphocytes T spécifiques d'épitopes conservés associés au *rPfMSP8*. De même, les IgG de lapin spécifiques de *PfMSP1/8* inhibent efficacement la croissance *in vitro* des souches FVO et 3D7 de *P. falciparum* au stade sanguin (124). Les candidats vaccins à base de *PfMSP1* testés, se sont révélés sûrs et très immunogènes (125). Toutefois, le polymorphisme antigénique, la redondance des voies d'invasion et les réponses anticorps spécifiques de souche constituent de nombreux obstacles au développement d'un vaccin MSP1 efficace.

1.5.1.3.2.2 L'antigène apical-1 de la membrane (AMA-1)

AMA-1 est exprimée aux stades sporozoïte et schizonte, où elle joue un rôle essentiel dans la survie du parasite (126). Le vaccin AMA-1/AS02 du stade sanguin n'a pas démontré d'efficacité globale, mais une efficacité spécifique des allèles de la souche vaccinale. Ceci suggère que AMA-1 pourrait être incluse dans un vaccin aux composants multiples (127). AMA-1 possède 16 résidus de cystéine conservés, qui divisent la protéine en trois sous-unités. Parmi celles-ci, la sous-unité AMA-1 (III), située dans la région C-terminale et génétiquement conservée, a été considérée comme un composant de candidat vaccin. Ainsi, la protéine chimérique *Pf 2.9* (*PfCP-2.9*), composée des séquences *MSP1₁₉* et AMA-1 (III), induisait des anticorps chez les lapins et les singes (128). L'innocuité et l'immunogénicité de *PfCP-2.9* formulée avec le nouvel adjuvant Montanide ISA 720 ont été testées, et les candidats vaccins ont montré leur innocuité et leur immunogénicité (128).

1.5.1.3.2.3 La protéine Rh5

Rh5, le plus important candidat vaccin du stade sanguin, envahit rapidement les GRs en formant un complexe avec le cyRPA et le Ripr et en se liant à la base des GRs. Le vaccin ciblant le Rh5 peut empêcher l'invasion par le *Plasmodium* (104). Des études ont montré que p113 (une protéine de surface du mérozoïte) peut interagir directement avec la région N terminale de

Rh5, et peut donc être développée comme un candidat vaccin (129). Par ailleurs, des anticorps monoclonaux humains (AcM) spécifiques de *Pf*Rh5 ont été isolés des cellules B du sang périphérique de volontaires. Un sous-groupe d'anticorps neutralise tandis que l'autre sous-groupe ralentit la vitesse de liaison entre le Rh5 et les récepteurs des GRs, rendant ainsi les anticorps au Rh5 plus efficaces (130). Seuls quelques candidats vaccins (comme le vaccin Rh5.1/AS01B) ont été autorisés pour les essais cliniques de Phase I/IIa. Cependant, davantage de données sur la sécurité, l'immunogénicité et l'efficacité des vaccins au stade sanguin sont encore nécessaires (131).

1.5.1.3.3 Les vaccins ciblant les stades sexués et chez le moustique

Encore appelés vaccins bloquant la transmission (TBV), les vaccins ciblant les stades sexués et chez le moustique permettent de contrôler le transfert du *Plasmodium* des hôtes humains aux moustiques vecteurs. L'induction d'une immunité bloquant la transmission a été démontré la première fois dans les années 1950, chez des jeunes poules par des immunisations répétées avec des GRi par *P. gallinaceum* (132). Des travaux ultérieurs ont montré que les antigènes exprimés plus tard au cours du développement du parasite après la fécondation peuvent être ciblés(133). Ainsi, Sherrard et collègues ont découvert que les TBV pouvaient réduire la densité parasitaire dans les glandes salivaires des moustiques, améliorant ainsi l'efficacité des vaccins pré-érythrocytaires (134). Les principaux candidats TBV comprennent les *Pfs*25, *Pfs*48/45 et *Pfs*230 (104).

1.5.1.3.3.1 *Pfs*25

*Pfs*25, un antigène de 25 kDa présent à la surface des gamètes et des zygotes de *P. falciparum* chez le moustique (135), est l'un des TBV en développement clinique les plus avancés. En 2008, un essai clinique de Phase I utilisant le *Pfs*25 comme antigène a été achevé (136). Plus tard, La fusion de *Pfs*25 à l'IMX313 (domaine d'oligomérisation de la protéine de liaison C4b (C4 bp)₁₅ inhibitrice du complément de poule) et l'expression dans des vecteurs viraux ChAd63 et MVA induit une réponse anticorps qualitativement meilleure par rapport au *Pfs*25 seul, ainsi que des réponses du centre germinatif significativement plus élevées (137). De même, l'expression de *Pfs*25 dans le *Baculovirus* et le *Pichia pastoris* entraînait des résultats prometteurs (135).

1.5.1.3.3.2 *Pfs*48/45

*Pfs*48/45, exprimé sur les surfaces des gamétocytes (à partir du stade sanguin sexué) et des gamètes, est lié à la membrane du parasite par un ancrage GPI. Il forme avec le *Pfs*230 un

complexe stable. Des études précliniques ont montré que des anticorps bloquant la transmission peuvent être induits par l'immunisation avec *Pfs48/45* (138). Cependant, des anticorps humains spécifiques des protéines *Pfs48/45* et *Pfs230* ont été étudiés au centre du Ghana (139), où leur séroprévalence était respectivement de 74,7% et 72,8% (138). Par ailleurs, les vaccins SpyCatcher-R0.6C et SpyCatcher-6C à base de *Pfs48/45* et exprimés sous forme de particules virales induisaient une immunogénicité significativement élevée lorsqu'ils étaient administrés avec le Montanide ISA 720 VG (140).

1.5.1.3.4 Les vaccins spécifiques de *P. vivax*

La plupart des travaux de développement de vaccins se sont concentrés sur *P. falciparum*. Un vaccin efficace pourrait également faciliter l'élimination de *P. vivax* dans de nombreuses régions d'Amérique et d'Asie où la lutte est confrontée aux défis liés à la biologie du parasite (141).

En effet, un vaccin pré-érythrocytaire efficace pourrait réduire les infections primaires et empêcher la formation d'hypnozoïtes, réduisant ainsi le risque de rechutes multiples contribuant à la transmission (142). À ce jour, deux vaccins sous-unités ciblant le PvCSP ont atteint le stade des essais cliniques (143). Ainsi, la protéine soluble VMP001/AS01, immunogène chez des volontaires américains n'induisait pas une protection stérile à la suite d'une piqûre de moustique (144) tandis que le CSV-S,S/AS01, un vaccin similaire au RTS,S/AS01, n'a pas progressé (145).

Au stade sanguin, l'invasion de *P. vivax* est limitée aux réticulocytes qui expriment le récepteur 1 de la transferrine (TfR1/CD71) et nécessite l'interaction de la protéine de liaison de l'antigène Duffy de *P. vivax* (PvDBP) avec le récepteur de l'antigène Duffy humain pour les chimiokines (DARC/Fy) (146). En effet, les deux vaccins de *P. vivax* en développement clinique actif ciblent la région II extracellulaire conservée, riche en cystéine (PvDBP RII). Les résultats de l'essai de phase Ia révèlent une immunogénicité prometteuse (147).

Concernant le blocage de la transmission, le premier TBV, un vaccin à base de protéine *Pvs25H*/Alhydrogel induisait des anticorps mais les vaccinations au cours du deuxième essai avec l'adjuvant Montanide ISA51 ont été interrompues en raison d'une réactivité inattendue (136). Pour l'instant, de nouveaux candidats TBV cliniques pour *P. vivax* sont attendus.

1.5.2 Le traitement curatif

L'une des difficultés majeures du traitement du paludisme réside actuellement dans la progression des résistances de *P. falciparum* vis à vis des antipaludiques en général. Actuellement, les résistances continuent de progresser à la fois en terme d'intensité et sur le plan géographique.

1.5.2.1 Les antipaludiques

Les médicaments antipaludiques peuvent être classés en fonction de leur activité antipaludique et de leur structure.

Ainsi on distingue en fonction de l'activité (148) :

- **Les schizonticides tissulaires pour la prophylaxie causale** agissant sur les formes tissulaires primaires pré-érythrocytaires des plasmodies. En bloquant cette étape, le développement ultérieur de l'infection peut théoriquement être empêché. La pyriméthamine et la primaquine ont cette activité.
- **Les schizonticides tissulaires pour la prévention des rechutes** qui agissent sur les hypnozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale* dans le foie. La primaquine est le médicament prototype ; la pyriméthamine a également cette activité.
- **Les schizonticides sanguins** ayant pour cible les formes sanguines du parasite. Ce sont les médicaments les plus importants dans la chimiothérapie antipaludique. Ceux-ci comprennent la chloroquine, la quinine, la méfloquine, l'halofantrine, la pyriméthamine, la sulfadoxine, les sulfones, les tétracyclines, etc.
- **Les gamétocytocides** détruisant les formes sexuelles du parasite dans le sang et empêchant ainsi la transmission de l'infection au moustique. La chloroquine et la quinine ont une activité gamétocytocide contre *P. vivax* et *P. malariae*, mais pas contre *P. falciparum*. La primaquine a une activité gamétocytocide contre toutes les plasmodies, y compris *P. falciparum*.
- **Les sporontocides** qui empêchent le développement des oocystes chez le moustique et ainsi la transmission. La primaquine et le chloroguanide ont cette action.

En fonction de la structure on distingue :

- **Les aryl-amino-alcools** représentés la quinine un dérivé naturel à action schizonticide rapide sur toutes les espèces mais aussi gamétocytocide contre *P. vivax* et *P. malariae*. La quinine agirait en inhibant l'hème polymérase entraînant ainsi l'accumulation de l'hème dans la vacuole parasitophore (148). Elle est indiquée en deuxième intention dans le

traitement de l'accès palustre grave. On y retrouve également la méfloquine, schizonticide endo-érythrocytaire indiqué dans la prophylaxie chez les voyageurs non immuns en zone de chimiorésistance (149). La méfloquine se lie à l'hème libre entraînant la formation de complexes toxiques qui altèrent la membrane de la vacuole parasitophore (148).

- **Les amino-4-quinoléines** regroupant la chloroquine et l'amodiaquine. La chloroquine a une action schizonticide sur formes érythrocytaires des Plasmodies. Le mécanisme d'action de la chloroquine n'est pas très bien connu. La molécule agirait en inhibant l'hème polymérase entraînant une accumulation de l'hème toxique. Elle pourrait également perturber la synthèse des acides nucléiques. Son usage antipaludique modifié est restreint au traitement curatif des accès à *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae* de l'adulte et de l'enfant de plus de 10kgs.
- **Les amino-8-quinoléines** représentés par la primaquine, une ancienne molécule réintroduite dans le traitement des accès à *P. vivax* et *P. ovale* pour la prévention des rechutes.
- **Les inhibiteurs de la synthèse des folates** existant sous deux types. Le type 1 regroupe les sulphones et sulphonamides (sulfadoxine) tandis que le type 2 comprend les biguanides (proguanil) et diaminopyrimidine (pyriméthamine). La sulfadoxine empêche l'utilisation de l'acide para-aminobenzoïque lors de la synthèse de l'acide dihydroptéroïque. Elle est utilisée en combinaison avec la pyriméthamine qui bloque la biosynthèse des purines et pyrimidines nécessaires à la synthèse de l'ADN. La synergique d'action de ces deux molécules inhibe la division du *Plasmodium* .(148) Le proguanil agit par l'intermédiaire de son métabolite le cycloguanil en inhibant la dihydrofolate réductase. Il est actif sur les formes tissulaires hépatiques de *P. falciparum* .
- **Les naphthoquinones** comprenant l'atovaquone utilisé en association avec le proguanil pour la prophylaxie du paludisme à *P. falciparum* chez les voyageurs se rendant en zone d'endémie présentant des chimiorésistances aux amino-4-quinoléines. L'association bloque la synthèse des pyrimidines et entraînent ainsi une inhibition de la réplication de l'acide désoxyribonucléique du *Plasmodium* (149).
- **Les antimicrobiens** avec la doxycycline un antibiotique de la famille des tétracyclines. La doxycycline en se liant à la sous-unité ribosomale 30s, inhibe la synthèse protéique et altère la membrane cytoplasmique du *Plasmodium* exerçant ainsi une activité schizonticide sanguine. Cette molécule est utilisée dans chimioprophylaxie du paludisme chez voyageur dans les zones d'endémie en cas de résistance à la méfloquine (149).

- **Les peroxydes** qui regroupent les dérivés de l'artémisinine, inhibent l'ATPase calcique du réticulum sarcoplasmique et endoplasmique de *P. falciparum*. Ils représentent actuellement les médicaments de première ligne pour le traitement des accès palustres en raison de leur action schizonticide érythrocytaire rapide. Ils possèdent également une action gamétocytocide (149). La plupart des artémisinines utilisées en clinique sont métabolisées en dihydroartémisinine, forme sous laquelle elles ont une activité antipaludique. Elles possèdent une demi-vie brève et leur utilisation en monothérapie est associée à une incidence élevée de la recrudescence des infections. Ils constituent les antipaludiques les plus rapides disponibles. Ces médicaments commencent à agir dans les 12 heures en inhibant le développement des trophozoïtes et empêchent ainsi la progression de la maladie. Les jeunes parasites en circulation sont tués avant leur séquestration dans la micro-vascularisation profonde. Ces propriétés du médicament sont très utiles dans la gestion du paludisme grave à *P. falciparum*. Ils sont également efficaces contre les souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine. Il a été démontré que l'artésunate et l'artéméther éliminent les parasitémies plus efficacement que la chloroquine et la sulfadoxine / pyriméthamine (148). Il a également été prouvé que les médicaments à base d'artémisinine éliminaient les parasites plus rapidement que la quinine chez les patients atteints de paludisme grave, mais la clairance de la fièvre était similaire¹²². De plus, l'artéméther parentéral et l'artésunate sont plus faciles à utiliser que la quinine et n'induisent pas d'hypoglycémie. Elles sont associées généralement, dans le traitement des accès simples, à un autre antipaludique de demi-vie plus longue pour une efficacité maximale (148,149).

1.5.2.2 Le traitement du paludisme non compliqué

1.5.2.2.1 Le paludisme non compliqué à *P. falciparum*

L'OMS recommande le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* chez les enfants et les adultes (sauf les femmes enceintes au cours du premier trimestre) atteints de paludisme avec l'une des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) suivantes (21):

- Artéméther + luméfantrine
- Artésunate + amodiaquine
- Artésunate + méfloquine
- Dihydroartémisinine + pipéraquline
- Artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine (SP).

La durée d'un traitement à base de dérivés d'Artémisinine est de 3 jours.

Dans les zones de faible transmission de *Plasmodium*, l'administration d'une dose unique de primaquine avec CTA aux patients atteints de paludisme à *P. falciparum* (sauf les femmes enceintes, les nourrissons âgés de <6 mois et les femmes allaitant les nourrissons âgés de <6 mois) permet de réduire transmission (21).

1.5.2.2.2 Le paludisme non compliqué à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*

Le traitement du paludisme non compliqué à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* est fonction du stade parasitaire de l'infection, de l'espèce et de la zone de résistance à la chloroquine. Cependant, en présence d'une infection du stade sanguin dont l'espèce de *Plasmodium* n'est pas connue avec certitude, il est recommandé de traiter comme pour le paludisme à *P. falciparum* (21). Aussi, dans les zones où la résistance à la chloroquine est absente, le traitement des adultes et les enfants atteints de paludisme non compliqué à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ou *P. knowlesi* avec un CTA (sauf les femmes enceintes au premier trimestre) ou de la chloroquine est recommandé. Au contraire, dans les zones de résistance à la chloroquine, le traitement recommandé pour les adultes et les enfants atteints de paludisme non compliqué à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ou *P. knowlesi* (sauf les femmes enceintes au cours du premier trimestre) est un CTA (21).

Par ailleurs, le traitement des stades hépatiques (hypnozoïtes) de *P. vivax* et *P. ovale* permet de prévenir les rechutes. Chez les enfants et les adultes (sauf les femmes enceintes, les nourrissons âgés de moins de 6 mois, les femmes allaitant les nourrissons de moins de 6 mois, les femmes allaitant les nourrissons plus âgés, sauf s'ils sont connus pour ne pas être déficients en G6PD et les personnes avec déficit en G6PD) le traitement est basé sur la prise de la primaquine pendant 14 jours quel que soit le niveau de transmission (21).

1.5.2.3 Le traitement du paludisme grave

L'OMS recommande, en plus du traitement symptomatique l'utilisation de l'artésunate pour le traitement des adultes et enfants atteints de paludisme grave (y compris les nourrissons, les femmes enceintes dans tous les trimestres et les femmes allaitantes) par voie intraveineuse ou intramusculaire pendant au moins 24 h et jusqu'à ce qu'ils puissent tolérer les médicaments par voie orale. La poursuite du traitement chez un patient ayant reçu au moins 24 h de traitement parentéral et pouvant tolérer un traitement par voie orale, se fait pendant 3 jours avec CTA. Une dose unique de primaquine est ajoutée dans les zones de faible transmission (21). En l'absence

de l'artésunate parentéral (et rectal chez l'enfant), l'utilisation de l'artéméther de préférence à la quinine pour traiter les enfants et les adultes atteints de paludisme grave est recommandée (21).

1.6 Immunité anti-palustre

Au cours de son cycle de vie complexe, le *Plasmodium* exprime une grande variété de protéines à différents stades, mais ces protéines changent fréquemment. En conséquence, l'infection palustre naturelle provoque une immunité partielle, de courte durée, incapable de protéger l'individu contre une nouvelle infection. L'immunité contre la malaria peut être subdivisée en immunité innée et en immunité acquise ou adaptative.

1.6.1 Immunité innée

L'infection palustre aiguë induit une réponse immunitaire non spécifique qui contribue à limiter la progression de la maladie.

1.6.1.1 La reconnaissance du *Plasmodium*

L'organisme réagit à diverses infections en détectant certaines molécules (structures de signature) conservées au cours de l'évolution de pathogènes, appelées *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). L'organisme détecte les PAMP par le biais de récepteurs appelés récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR). L'organisme détecte également certains facteurs endogènes libérés lors de l'infection et peut provoquer un signal de danger. Ces facteurs sont appelés *danger-associated molecular patterns* (DAMP). Les plasmodies sont détectées par plusieurs récepteurs, ce qui entraîne une activation des cellules et des réponses immunitaires.

1.6.1.2 Les molécules impliquées dans la reconnaissance du *Plasmodium*

Plusieurs PAMPs du *Plasmodium* ont été identifiés, et les mécanismes de reconnaissance ainsi que les voies de signalisation et les réponses immunitaires associées ont été déterminés(150–152) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Molécules de reconnaissance du *Plasmodium* et voies de signalisation (153).

PAMPs et DAMPs	PRRs		Voies
TLRs			
GPI	TLR1, 2	Surface cellulaire	MAPK, NF- κ B
GPI,Hème,	TLR4	Surface cellulaire	MAPK, TRIF, NF- κ B
ARN	TLR7	Endosome	MAPK, NF- κ B
ADN	TLR9	Endosome	MAPK, NF- κ B
Récepteurs cytosoliques			
ARN	MDA5	Cytoplasme	MAVS-TBK1-IRF3/IRF7
ADN	cGAS	Cytoplasme	STING-TBK1-IRF3/IRF7
ADN	AIM2	Cytoplasme	NLRP3 inflammasome
Signal de danger			
Hémozoïne	-	Cytoplasme	NLRP3 inflammasome
Acide urique	-	Cytoplasme	NLRP3 inflammasome
Facteur non identifié	-	Cytoplasme	NLRP12 et NLRP4
Récepteurs phagocytaires			
<i>Pf</i> EMP1, ligands non	CD36	Surface cellulaire	Src/Syk, MAPK
Récepteurs d'adhésion			
<i>Pf</i> EMP1	ICAM1	Surface cellulaire	Src-PI3K-Akt, Rho, MAPK
<i>Pf</i> EMP1	EPCR	Surface cellulaire	Inconnu

1.6.1.3 La reconnaissance du *Plasmodium* au niveau du foie

L'infection palustre étant cliniquement silencieuse au stade hépatique, on a longtemps pensé que les parasites à l'intérieur des hépatocytes se développaient sans être détectés par le système immunitaire inné. Cependant, des études récentes sur des souris infectées par *P. berghei* et *P. yoelii* montrent que, bien que les parasites à l'intérieur des hépatocytes soient protégés de la reconnaissance par les macrophages et les cellules dendritiques (CD), les parasites en croissance sont reconnus par les PRRs cytosoliques des hépatocytes, déclenchant ainsi une réponse antiparasitaire IFN de type I (154,155). Dans les hépatocytes infectés, l'ARN parasitaire est détecté par la protéine 5 associée à la différenciation du mélanome (MDA5). Il s'en suit une activation de la voie de signalisation MDA5-MAVS-IRF3/IRF7 et la production

de l'IFN de type I (154,155) (**figure 13A**). L'interaction avec le récepteur de l'IFN de type I (IFN α R) entraîne une série de réponses immunitaires innées qui comprennent : (i) l'expression des gènes de l'interféron par les hépatocytes; (ii) la production de chimiokines et le recrutement par chimiotactisme de macrophages, de neutrophiles et de lymphocytes à proximité des hépatocytes infectés; (iii) la sécrétion d'IFN- γ et de chimiokines par les cellules NK et NKT, abondamment présentes dans le foie ; (iv) l'infiltration des cellules NK et NKT dans le foie ; (v) la destruction des hépatocytes infectés CD1d⁺ par les cellules NKT (154,155).

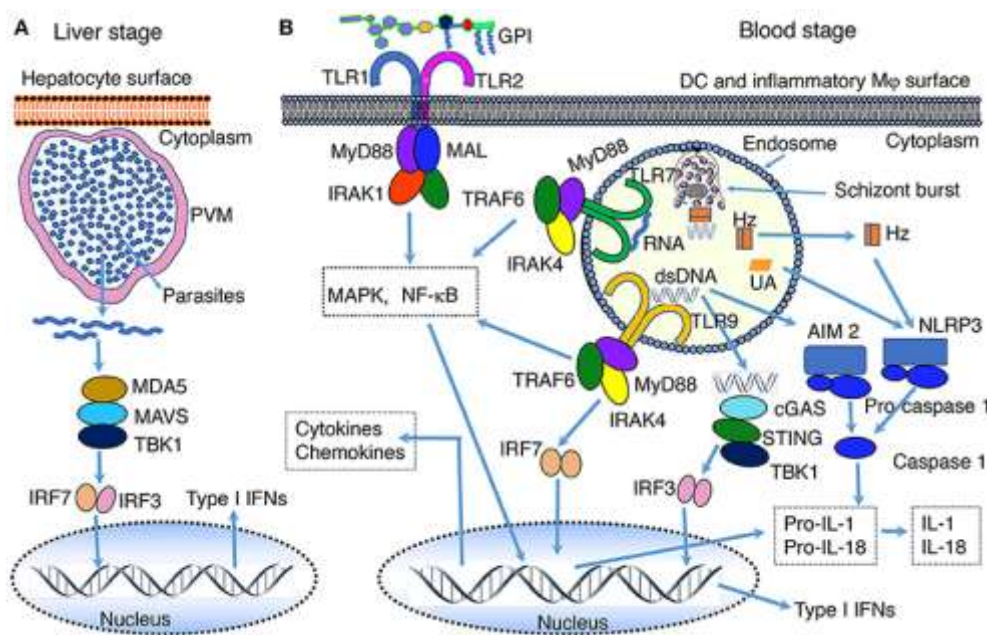


Figure 13. Représentation simplifiée des voies de signalisation induites par l'interaction PRR-PAMP dans l'immunité innée au cours du paludisme (153).

(A) Mécanisme de reconnaissance de l'ARN parasitaire au stade hépatique ; (B) Mécanisme de reconnaissance du parasite au stade sanguin. DC, dendritic cell; M ϕ , macrophage; GPI, glycosylphosphatidylinositol; Hz, hemozoin; UA, uric acid; IFN α R, type I IFN- α receptor; TLR, toll-like receptor; MyD88, myeloid differentiation factor 88; MAL, MyD88 adapter-like; IRAK, IL-1 receptor-associated kinase; TRAF6, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; MAPK, mitogen-activated protein kinases; NF- κ B, nuclear factor κ B; TBK1, TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1; cGAS, cyclic GMP-AMP synthase; STING, stimulator of IFN genes; MDA5, melanoma differentiation-associated gene 5; MAVS, mitochondrial antiviral-signaling protein; IRF, IFN regulatory factor; AIM2, absent in melanoma 2; NLRP, NOD- LRR- and pyrin domain-containing protein.

Les parasites, résidant à l'intérieur de la vacuole parasitophore, il semble que l'ARN du parasite soit exporté vers le cytosol, mais pas vers les phagolysosomes. De plus, il est peu probable que l'ARN cytosolique puisse pénétrer dans les endosomes et les hépatocytes peuvent ne pas exprimer des niveaux significatifs de TLR7. Ainsi, les PRRs cytosoliques pourraient être les seuls qui interagissent avec les facteurs parasitaires dans les hépatocytes infectés. Cependant, le rôle de l'ADN parasitaire dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée au stade hépatique de l'infection n'est pas très bien connu.

1.6.1.4 La reconnaissance du *Plasmodium* au stade sanguin

L'éclatement des GRs au stade de schizonte libère des quantités importantes de vacuoles digestives parasitaires contenant de l'hémozoïne et d'autres déchets. Le développement synchrone des parasites favorise l'accumulation de composants parasitaires qui atteignent des concentrations maximales auxquelles le système immunitaire inné répond intensivement en induisant la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires à des niveaux élevés (39).

Au stade sanguin de l'infection, l'ADN, l'ARN et le GPI du parasite interagissent respectivement avec les TLR9, TLR7 et TLR2, entraînant principalement l'activation des voies de signalisation MAPK et NF- κ B et la synthèse de cytokines et chimiokines (**figure 13B**). Dans le cytosol, l'ARN parasitaire comme au stade hépatique, est détecté dans les GRi par MDA5, ce qui entraîne l'activation de la signalisation MAVS-TBK1-IRF3/IRF7 (**figure 13A**). Cependant, cette signalisation semble induire l'expression de *suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1), qui diminue la production d'IFN de type I induite par l'interaction ARN-TLR7 (156). L'ADN du parasite dans le cytosol est détecté par le *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS), provoquant l'activation de la voie de signalisation STING-TBK1-IRF3 et une réponse IFN de type I. L'ADN du parasite stimule également l'inflammasome AIM2, qui clive la pro-caspase 1 aboutissant à la caspase 1. De même, l'hémozoïne (Hz) et l'acide urique (UA) induisent un signal de danger, activant l'inflammasome NLRP3 et le clivage de la pro-caspase 1 (**Figure 13B**).

Par ailleurs, les parasites peuvent activer l'inflammasome NLRP12 par une interaction non identifiée, entraînant le clivage de la pro-caspase 1 (150,157). Les microparticules libérées par les GRi et l'hème produit pendant l'infection semblent activer le TLR4 (158,159). L'activation du TLR4 par coopération avec des protéines accessoires CD14 et MD2 active les voies de signalisation MAPK, NF- κ B et TRIF-TBK1-IRF3 (150,160).

1.6.2 Réponses immunitaires innées contre le *Plasmodium*

1.6.2.1 Réponse immunitaire innée au stade hépatique

Au stade hépatique, la détection de l'ARN parasitaire provoque la production des IFN de type I par les hépatocytes infectés. Cette réponse cytokinique contribue à la destruction des hépatocytes infectés par les cellules NKT, libérant ainsi les composants parasitaires. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), principalement les CD et les Macrophages, peuvent potentiellement reconnaître les facteurs parasitaires exposés. Cependant, les sporozoïtes injectés par les moustiques infectés qui n'ont pas pu entrer dans la circulation sanguine restent dans le derme et meurent. Toutefois, les sporozoïtes ayant pu atteindre la circulation sanguine peuvent ne pas envahir les hépatocytes et mourir. Ces parasites morts sont probablement dégradés par les CD et les macrophages, ce qui entraîne des réponses immunitaires médiée par les TLR et l'inflammasome. Les CPA activées sont capables de moduler les réponses immunitaires au stade sanguin. Cependant, la charge parasitaire hépatique au cours des infections naturelles est très faible et les réponses immunitaires innées sont probablement aussi très faibles. Ainsi, les réponses produites par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) au stade hépatique peuvent ne pas exercer une influence significative sur les réponses immunitaires induites par les parasites au stade sanguin. Cependant, dans les zones hyper-endémiques, les infections répétées chez l'homme peuvent induire une tolérance immunitaire par les CPA qui peuvent moduler dans une certaine mesure l'immunité contre l'infection du stade sanguin (153).

1.6.2.2 Réponse immunitaire innée au stade sanguin

Au cours du stade sanguin, les parasites se développent de manière exponentielle par des cycles érythrocytaires répétitifs, contrairement au stade hépatique, accumulant rapidement la biomasse. Cela engendre une stimulation efficace des réponses immunitaires innées. Au début du stade sanguin de l'infection, les CD et les macrophages sont les premiers acteurs de la réponse immunitaire innée. Toutefois, les macrophages après internalisation des GRi, des mérozoïtes ou de l'hémozoïne, deviennent immunosuppresseurs et dysfonctionnels(161,162), incapables de sécréter des cytokines et des chimiokines. Leur principal rôle au début du stade sanguin de l'infection palustre serait l'inhibition de la croissance du parasite par la clairance phagocytaire.

Contrairement aux macrophages, les CD produisent efficacement des cytokines et des chimiokines en réponse au *Plasmodium*, et interagissent efficacement avec les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Ainsi, les CD jouent un rôle important dans l'initiation et la régulation de l'immunité innée et adaptative contre le *Plasmodium*. Cependant, il faut noter

que certaines sous-populations de macrophages présentant certaines caractéristiques des CD, telles que les macrophages CD11c⁺ de la pulpe rouge de la rate et les macrophages CD169⁺ de la pulpe blanche, produisent des cytokines (163).

Au stade sanguin de l'infection palustre, les IFN de type I sont les cytokines les plus précocement produites (24 h après l'infection) par l'activation de la voie de signalisation TLR7-MyD88 et IRF7 (164). La réponse précoce à l'IFN de type I est produite principalement par les macrophages CD11c⁺ de la rate et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) chez les souris infectées par *P. chabaudi* (165). De même, il les macrophages CD169⁺ activés par la voie de signalisation STING migrent vers la moelle osseuse, où ils interagissent avec les pDC pour induire la production d'IFN de type I par la voie de signalisation TLR7-MyD88(166). Par ailleurs, les macrophages et les neutrophiles qui internalisent les parasites subissent une pyroptose, libérant les dérivés du parasite, qui sont repris par les CD classiques et les macrophages CD169⁺. La production précoce de l'IFN de type I déclenche l'infiltration de cellules immunitaires dans le sang qui peuvent ensuite se localiser dans la rate. Au contraire, chez les souris infectées par *P. berghei* ANKA, une faible production ou absence d'IFN- α pendant les trois premiers jours après l'infection et un niveau relativement élevé a été observé 4 jours après l'infection¹⁴². Ces résultats suggèrent que différentes souches de *Plasmodium* induisent différemment l'IFN de type I.

Dans certaines situations la synthèse précoce de l'IFN de type I au cours de l'infection palustre contribue à la suppression de l'immunité antiparasitaire et favorise la survenue de formes graves. En effet, le déficit en récepteur de l'IFN α (IFN α R) dans l'infection par *P. yoelii* YM entraîne une augmentation des niveaux d'IFN- γ , une diminution significative de la parasitémie et la survie dépendante de la charge parasitaire(166). De même, chez les souris infectées par *P. berghei* ANKA, qui produisent de faibles niveaux de réponse précoce à l'IFN de type I mais qui en produisent une quantité significative à un stade un peu plus tardif (4 jours après l'infection), le déficit en IFN α R ou le traitement par anticorps anti-IFN α R1 entraîne une augmentation de la production d'IFN- γ , un nombre accru de cellules NK et T CD4⁺ productrices d'IFN- γ dans la rate, et une diminution significative de la parasitémie et la protection contre le paludisme cérébral (167,168). Ces résultats, évoquent un rôle suppresseur des IFN de type I sur la production d'IFN- γ et donc la fonction antiparasitaire.

En effet, les IFN de type I sont des cytokines pléiotropes capables d'induire plusieurs effets sur les cellules immunitaires innées et adaptatives au cours de diverses infections pathogènes, contribuant ainsi à la protection contre l'infection ou la pathogénèse(169). Ces différents effets dépendent probablement des niveaux d'IFN de type I, de faibles niveaux au

début de l'infection entraînent une immunité à médiation cellulaire tandis des niveaux élevés provoquent une immunosuppression (169). Les IFN de type I produits pendant l'infection palustre pourraient également entraîner de nombreux effets cellulaires impliquant une interaction complexe entre divers types de cellules.

Cependant, les CD produisent plusieurs cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- α , l'IL-12 et l'IL-6, et des chimiokines, telles que CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL5, CXCL9 et CXCL10 en réponse au *Plasmodium*, et jouent un rôle crucial dans l'immunité et la pathogénèse du paludisme^{145,146}. Les IFN de type I stimulent les CD pour une production efficace de cytokines et de chimiokines. Ils activent également les cellules NK, NKT, T et T $\gamma\delta$ pour induire l'IFN- γ et d'autres réponses inflammatoires(169). L'IL-12 produite par les CD active les cellules NK pour induire la production d'IFN- γ , favorisant les réponses des cellules Th1 et des cellules T effectrices(170). La production accrue d'IFN- γ contribue à un contrôle efficace de la parasitémie en stimulant les macrophages et les neutrophiles pour une activité phagocytaire intense (171). Les chimiokines favorisent le recrutement de cellules immunitaires pour une réponse immunitaire antiparasitaire à médiation cellulaire efficace (172) (**Figure 14**).

Globalement, les réponses immunitaires innées initiales visent principalement à contrôler la croissance du parasite en potentialisant l'immunité antiparasitaire à médiation cellulaire. Toutefois, comme les réponses pro-inflammatoires contribuent à la pathogénèse, à mesure que l'infection progresse, la fonction des CD passe des phénotypes pro-inflammatoires et inducteurs de Th1 aux phénotypes anti-inflammatoires et inducteurs de Th2 (173).

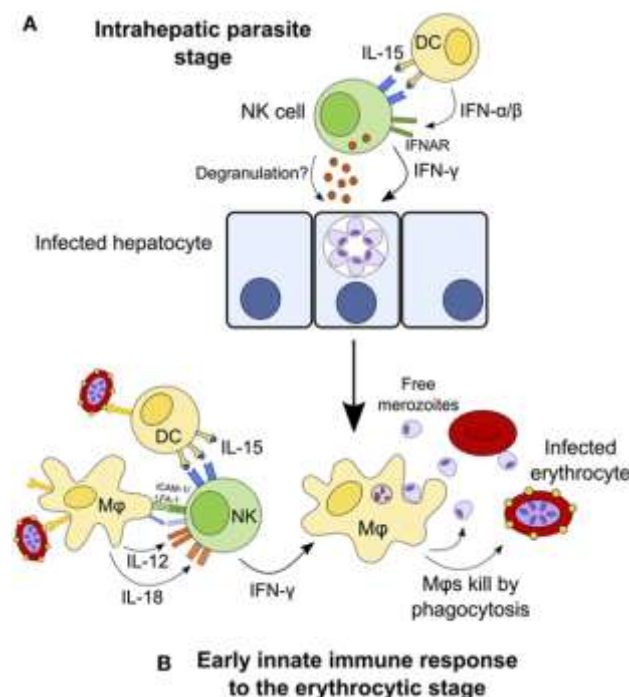


Figure 14. Rôle des cellules NK au cours des réponses immunitaires anti-palustre (174).

(A) Les cellules NK peuvent détruire les hépatocytes infectés par la cytotoxicité médiée par la perforine et la granzyme ou par l'apoptose induite par le récepteur de mort, ou peuvent tuer le parasite dans l'hépatocyte par l'induction de radicaux toxiques par l'intermédiaire de cytokine. (B) Au cours du stade érythrocytaire précoce de l'infection, les cellules NK sont activées par les cytokines produites par les macrophages et les cellules dendritiques (CD) et libèrent à leur tour l'interféron gamma (IFN- γ) pour activer les macrophages qui phagocytent les érythrocytes infectés.

1.6.3 Immunité adaptative

1.6.3.1 Immunité cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire occupe une place importante dans la protection contre le paludisme, mais peut également provoquer des désordres pathologiques contribuant au développement de la maladie (175).

1.6.3.1.1 Présentation des antigènes parasitaires

La capacité des CPA à capturer et à apprêter l'antigène parasitaire détermine la qualité et l'amplitude des réponses des lymphocytes T(LT)(176). En effet, il a été observé que les CPA influencent le développement de réponses cellulaires dans des modèles expérimentaux de paludisme, notamment les cellules dendritiques conventionnelles (cCD) indispensables pour l'activation des LT dans le paludisme cérébral expérimental causé par *P. berghei* ANKA(177).

Après la phagocytose des sporozoïtes, des débris d'hépatocytes infectés, du CSP contenu dans le vaccin RTS,S ainsi que des mérozoïtes et des GRi, les CD apprêtent et présentent les antigènes du *Plasmodium* aux LT CD8⁺ et CD4⁺ naïves (**Figure 15**, étape 1). Les CD de type CD8 α ⁺ situées dans les ganglions lymphatiques drainant la peau et la rate, ainsi que les cellules de type CD11c⁺CSF1R⁺ dans les ganglions lymphatiques drainant le foie (**Figure 15**, étape 2), servent de CPA et jouent un rôle important dans l'activation des réponses adaptatives dirigées contre le *Plasmodium*.

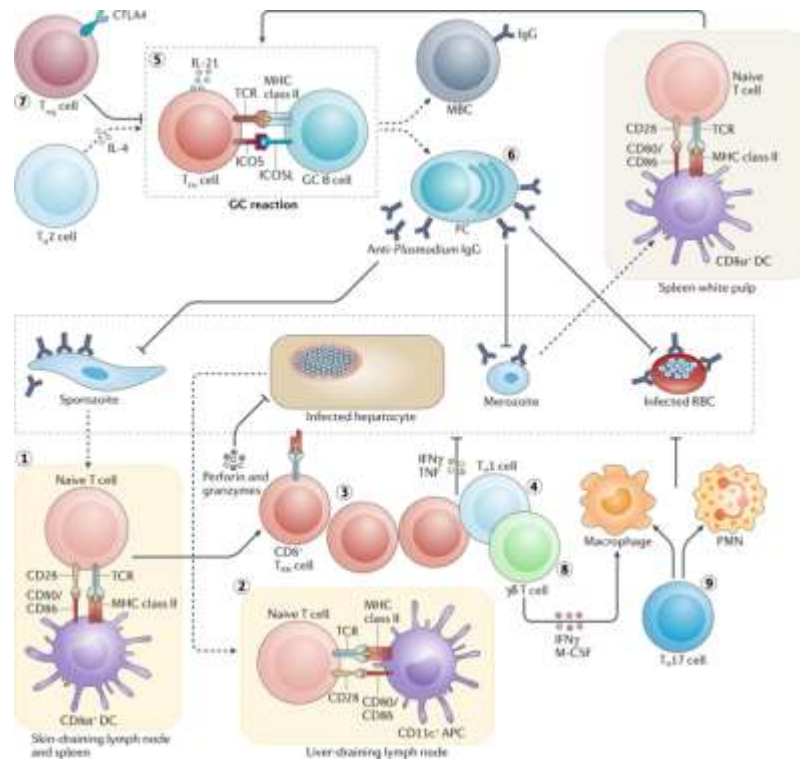


Figure 15 : Représentation schématique du rôle des LT dans la réponse immunitaire contre le *Plasmodium* (178).

RBCs, infected red blood cells; DC, dendritic cell, APC, antigen-presenting cells; TRM, tissue-resident memory; TH1, T helper 1 cell; TFH, T follicular helper; GC, germinal centre; ICOS, inducible T cell co-stimulator; MBCs, memory B cells; PCs, long-lived antibody-secreting plasma cells; ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; pRBCs, parasitized RBCs; Treg, regulatory T; Tr1, T regulatory type 1; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; PMN, polymorphonuclear cells (neutrophils); TCR, T cell receptor.

1.6.3.1.2 Les réponses des lymphocytes T

Après coopération avec les CD, les LT $CD8^+$ mémoires spécifiques des stades pré-érythrocytaires et résidant au niveau des tissus sécrètent l'IFN- γ et le TNF, déclenchant la mort cellulaire extrinsèque des hépatocytes infectés via l'expression de perforine et de granzyme (**Figure 15**, étape 3). Les LT $CD4^+$ peuvent également détruire les hépatocytes infectés exprimant des molécules du CMH de classe II. La production continue de cytokines spécifiques, telles que l'IL-12 et l'IL-6, oriente la différenciation des LT $CD4^+$ vers les lignées de LT auxiliaires 1 (Th1) et de LT auxiliaires folliculaires (Tfh) (**Figure 15**, étape 4). Les LTh1 produisent de l'IFN- γ qui active les macrophages en augmentant leur fonction phagocytaire et stimule la production de dérivés réactifs de l'oxygène qui sont toxiques pour le parasite. Les

LTfh engagent les lymphocytes B (LB) spécifiques du *Plasmodium* et organisent la réaction dans le centre germinatif, où ils expriment des molécules de costimulation *inducible T cell co-stimulator* (ICOS). Les Tfh sécrètent des facteurs solubles IL-4 et IL-21 qui favorisent la commutation isotypique de classe des anticorps, la maturation d'affinité et l'hypermutation somatique dans les LB des centres germinatifs, ainsi que la génération de lymphocytes B mémoires (LBM) et de plasmocytes sécrétant des anticorps à longue durée de vie (**Figure 15**, étape 5).

Les cellules T CD8⁺ cytotoxiques sont également capables de détruire les réticulocytes infectés qui expriment temporairement les molécules du CMH de classe I. Les réponses des LB et des LT CD4⁺ et CD8⁺ sont modulées par d'autres LT αβ, notamment les LT régulateurs (Treg), les LT CD4⁺ sécrétant de l'IL-27 et les LT régulateurs de type 1 (Tr1) (**Figure 15**, étape 7). Les cellules T γδ (LTγδ) sont activées par des stimuli inconnus en réponse à une infection des hépatocytes et des GRs (**Figure 15**, étape 8). Les LTγδ sécrètent des cytokines telles que l'IFN-γ et des facteurs d'activation myéloïdes comme le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). Aussi, ces cellules favorisent probablement l'élimination du *Plasmodium* aux stades hépatique et sanguin en orchestrant et en amplifiant l'activité des phagocytes. Par ailleurs, les rôles des lymphocytes Th2 et Th17 ne sont claires mais semblent être liées d'une part au recrutement et à l'activation des phagocytes, d'autre part à la promotion de l'activation des LB spécifiques du *Plasmodium* dans les centres germinatifs (**Figure 15**, étape 9).

1.6.3.2 Immunité humorale

Les preuves du rôle important des anticorps dans l'immunité contre le paludisme ont été liées aux études de transfert d'immunité au cours desquelles, des anticorps provenant d'adultes ont été utilisés avec succès pour traiter des patients atteints de paludisme (179). De même des études sur des souris déficitaires en récepteurs Fcγ soutiennent davantage le rôle important des anticorps (179). Les anticorps protecteurs peuvent cibler principalement les antigènes de surface des mérozoïtes, les ligands d'invasion des GRs et les antigènes variant de surface exprimés par des *pfGRi* (180,181).

1.6.3.2.1 Réponses pré-érythrocytaires

En zone d'endémie, les hôtes humains naturellement exposés à l'infection parasitaire développent des réponses anti-sporozoïtes, le plus souvent détectables chez les individus de plus de 50 ans et seulement chez une minorité d'enfants (182). Des essais *in vitro* avec des

sérums provenant de zones endémiques ont montré que les sérums réactifs aux sporozoïtes inhibent l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (183).

Les anticorps qui se lient aux sporozoïtes reconnaissent différents antigènes. Ainsi, les anticorps anti-CSP se lient à toute la surface des sporozoïtes et induisent l'excrétion de la protéine CSP. Plus important encore, ils inhibent l'infectivité des sporozoïtes *in vivo* et *in vitro* (177). Des études menées dans des zones endémiques ont révélé que la présence d'anticorps anti-CSP était corrélée à l'exposition et à la transmission, et leur taux augmentait avec l'âge (184).

De même, il a été observé que des sérums de personnes immunisées avec des sporozoïtes de *P. falciparum* contenaient des anticorps spécifiques de la protéine TRAP et que ces anticorps inhibaient l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes *in vitro* (185). Au Mali, la présence d'anticorps anti-TRAP a été associée à une plus faible parasitémie, à une protection contre l'infection (186), et à une protection contre le paludisme cérébral (187). Les anticorps anti-TRAP ont une courte durée de vie chez les enfants, et diminuent de manière significative pendant la saison sèche (186).

La protéine LSA1 est largement reconnue par les sérums d'individus vivant dans des zones endémiques (188). Des études utilisant des sérums d'enfants gabonais ont signalé une association entre les titres d'anti-LSA1 et la résistance partielle à l'infection (189).

Cependant, l'évaluation des réponses anticorps contre des centaines d'antigènes de *Plasmodium* ont révélé que, par rapport à la réactivité au stade sanguin, il y avait une réactivité peu fréquente aux antigènes pré-érythrocytaires (190).

Dans l'ensemble, les études réalisées avec des sérums provenant de personnes vivant dans des zones endémiques et de volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés indiquent que le développement d'anticorps spécifiques dépend clairement de l'âge et de la dose de sporozoïtes inoculée.

1.6.3.2.2 Réponses érythrocytaires

Au stade sanguin de l'infection à *P. falciparum*, les LTfh, acteurs importants de la réponse immunitaire, jouent un rôle essentiel dans la production d'anticorps. Ainsi au début de l'infection, les LTCD4⁺ sont stimulés par les cytokines sécrétées par les CD pour se différencier en LTfh CXCR5⁺. Le niveau d'expression des autres marqueurs du LTfh (PD1, CXCR3, ICOS) traduit leur efficacité à aider les LB au cours de leur maturation. Les LTfh ICOS⁺PD1⁺CXCR3⁻ sont les plus efficaces pour aider les LBM des centres germinatifs à se différencier en plasmocytes à longue durée de vie et à produire des anticorps anti-*Plasmodium*. Les LTfh

ICOS⁺PD1⁺CXCR3⁺, moins efficaces, sont toujours capables de fournir une aide aux LB, mais à un degré moindre (191). Cependant, il a été suggéré que l'IL-10 pourrait jouer un rôle dans la régulation du développement des LTfh (192,193).

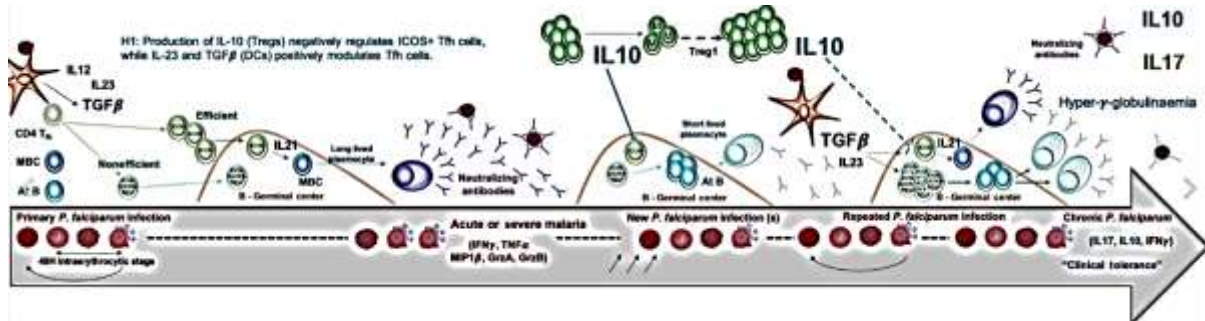


Figure 16 : Représentation schématique du rôle des LTCD4 dans la réponse immunitaire humorale spécifique du *Plasmodium* (194).

H1, hypothèse du rôle de régulation de l'IL-10.

- Antigènes du mérozoïte

Des études ont montré que les réponses les plus fortement associées à la protection contre le paludisme sont celles dirigées contre les protéines de surface MSP2 et MSP3 (195). Les anticorps dirigés contre les antigènes de surface des mérozoïtes agiraient en inhibant directement l'invasion des GRs par les mérozoïtes ou par opsonisation des mérozoïtes pour la phagocytose (196). Les résultats indiquent que les anticorps inhibiteurs peuvent être acquis très tôt chez les enfants mais leurs taux restent stables ou diminuent avec l'âge. Ces anticorps pourraient donc jouer un rôle important dans l'acquisition de la prémunition et de la protection contre les formes graves. Cependant, la réponse en sous-classe d'IgG pourrait également influencer la fonctionnalité des anticorps.

Par ailleurs, *P. falciparum* peut utiliser différentes voies d'invasion des GRs au cours du stade sanguin de l'infection en variant l'expression ou en utilisant des protéines d'invasion telles que l'antigène de liaison aux GRs (EBA) et *P. falciparum* reticulocyte-binding homologue (*PfRh*)(197,198). Cependant, chez l'homme, il a été observé que la variation du phénotype d'invasion modifie la sensibilité des parasites aux anticorps inhibiteurs et cette propriété parasitaire pourrait constituer un mécanisme d'échappement (199). Ainsi, des données indiquent que les niveaux élevés d'anticorps dirigés contre EBA et *PfRh* induisent des anticorps inhibant la croissance et fortement associés à la protection contre le paludisme chez les enfants (199).

Lors de l'invasion des réticulocytes par *P. vivax*, la protéine de liaison Duffy (DBP) joue un rôle essentiel et est fonctionnellement liée à l'antigène EBA de *P. falciparum* (200). Chez les enfants, il a été démontré que les anticorps bloquant la liaison du DBP à l'antigène Duffy étaient associés à une protection contre l'invasion des réticulocytes (201,202). Les anticorps anti-MSP1 ont également été associés à l'immunité contre *P. vivax* dans des études prospectives (203).

Toutefois, des études en Papouasie-Nouvelle-Guinée indiquent que l'acquisition de l'immunité à *P. vivax* dans l'enfance est sensiblement plus rapide que pour *P. falciparum* (204), ce qui pourrait refléter les différences biologiques entre les parasites.

- Antigènes exprimés à la surface du GRi

Au cours de son développement intra-érythrocytaire, *P. falciparum* exprime des antigènes hautement variant à la surface des GRs, appelés antigènes variant de surface (VSA). Ces antigènes comprennent *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP1*), rifines, STEVOR et d'autres antigènes (205) dont l'importance n'est pas bien connue à l'exception de *PfEMP1* qui est la cible la plus importante des anticorps (206). *PfEMP1* est codé par la famille des gènes *var*. Cependant, différents gènes *var* codent pour des variants de *PfEMP1* aux propriétés antigéniques et adhésives différentes (207). La diversité et la variation antigénique des *pfGRi* à travers l'expression de différents VSA, favorise les infections répétées à *P. falciparum* au fil du temps tandis que les nouvelles infections semblent être associées au défaut d'anticorps spécifiques des variants de *PfEMP1*. Des études prospectives chez les enfants montrent que les VSA sont des cibles de l'immunité protectrice (208). Les anticorps anti-VSA pourraient agir en opsonisant les GRi pour la phagocytose, ou pour la lyse médiée par le complément, ou encore en inhibant l'adhésion vasculaire et la séquestration. L'importance de ces différents mécanismes chez l'homme n'est pas bien établie. Toutefois, ils permettent de comprendre l'immunité protectrice pour le développement des vaccins.

1.6.3.2.3 Les mécanismes effecteurs médiés par les anticorps

Les anticorps spécifiques du *Plasmodium* ont pour rôle de fixer et d'immobiliser les sporozoïtes, de se lier aux mérozoïtes et aux GRi pour la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), de bloquer l'invasion des GRs par les mérozoïtes, d'inhiber la croissance des parasites par 'antibody-dependent respiratory burst' (ADRB), d'opsoniser les GRi pour faciliter leur phagocytose, d'inhiber l'adhérence des GRi aux GRs sains et d'activer le complément (**Figure 17**).

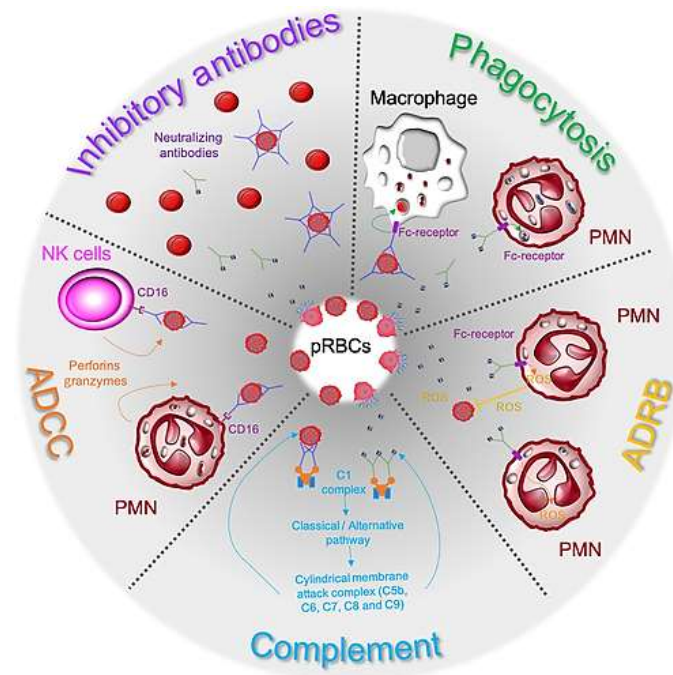


Figure 17 : Représentation schématique des mécanismes de l'immunité anti-palustre médiée par les anticorps (194).

Les anticorps inhibiteurs sont des anticorps neutralisants qui soit empêchent l'invasion des GRs en capturant des mérozoïtes libres dans le sang (anticorps verts) ou se lient aux antigènes de surface dérivés de *P. falciparum* des globules rouges parasités (pRBC) pour empêcher l'adhésion aux cellules hôtes (anticorps bleus); la phagocytose, par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (PMN) est médiée par des anticorps spécifiques qui se lient au récepteur Fc pour l'opsonisation des globules rouges parasités et des mérozoïtes; l'ADRB, est la capacité des polynucléaires neutrophiles (PMN) activés à produire et à sécréter des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui bloquent la progression de la croissance intracellulaire au sein des globules rouges parasités (pRBC); L'immunité médiée par le complément, implique la liaison du complexe C1 au fragment constant de la chaîne lourde de l'immunoglobuline; En utilisant la voie classique ou alterne, la cascade du complément déclenchera la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC : C5b, C6, C7, C8 et C9) qui perfore les membranes des globules rouges parasités (pRBC) et des mérozoïtes; l'ADCC, est un mécanisme utilisé par les cellules NK et les PMN pour détruire les pRBC; les anticorps se lient aux antigènes parasitaires exprimés à la surface des pRBC; le CD16 est le récepteur Fc γ exprimé sur les NK et les PMN qui déclenche la sécrétion de perforine et de granzyme pour tuer la cellule cible. Les anticorps inhibiteurs qui se lient aux sporozoïtes, hépatocytes infectés ou gamétocytes ne sont pas illustrés.

CHAPITRE 2 : Le paludisme associé à la grossesse (PAG)

2.1 Généralités sur le PAG

2.1.1 Epidémiologie du PAG

L'épidémiologie du PAG présente des particularités qui sont importantes pour décider des stratégies de contrôle appropriées.

2.1.1.1 La prévalence de l'infection palustre au cours de la grossesse

Il a été constaté dans les zones d'endémie palustre, une fréquence et une gravité d'infection plus importante chez les femmes enceintes que chez ces mêmes femmes avant la grossesse et chez leurs homologues non enceintes (209).

Ainsi, dans les zones de transmission stable du paludisme en Afrique, la prévalence de l'infection palustre périphérique ou placentaire au cours de la grossesse était de 27% (210). Ainsi, environ une femme enceinte sur quatre dans ces zones présente une infection palustre au moment de l'accouchement. Cependant, cette prévalence, basée sur des données de microscopie optique et ponctuelle, est sous-estimée (211).

Par ailleurs, dans les zones de transmission faible, instable et saisonnière d'Afrique peu de données sont disponibles. Les prévalences des infections périphérique et placentaire étaient respectivement de 13,7% et 6,7% (212). En dehors de l'Afrique, dans les zones à faible transmission, les prévalences respectives sont de 6,2 et 9,6%. Les données recueillies dans les zones à forte transmission saisonnière en Afrique indiquent que les infections palustres placentaires sont détectées plus fréquemment pendant la saison sèche, suggérant une persistance des infections placentaires pendant plusieurs mois (213).

En outre, il a été constaté que le risque accru de paludisme varie au cours de la grossesse. En effet, la prévalence de l'infection et la densité parasitaire sont les plus élevées au cours de la première moitié de la grossesse et diminuent progressivement jusqu'à l'accouchement, tandis que la parasitémie post-partum est généralement similaire aux niveaux pré-gravidiques (214).

2.1.1.2 La susceptibilité à l'infection palustre

La susceptibilité à l'infection et la gravité de la manifestation clinique du PAG sont déterminées par le niveau d'immunité pré-gestationnel qui dépend largement de l'intensité et de la stabilité de la transmission du paludisme (215). Ainsi, dans les régions où la transmission du paludisme est faible et/ou instable, le degré d'immunité acquise des femmes avant la

grossesse est probablement faible, ce qui rend la mère et le fœtus sensibles aux conséquences les plus graves de l'infection palustre (216). En revanche, dans les zones de forte endémicité palustre, les femmes ont acquis une importante immunité protectrice et les effets du paludisme sur la mère et le fœtus sont moins graves (217).

Cependant, la gestité constitue également un facteur important de susceptibilité et de gravité au PAG. Ainsi, dans les régions où la transmission est élevée et où le niveau d'immunité acquise contre le paludisme devrait être important, les primigestes sont beaucoup plus susceptibles au PAG (218). De même, il a été observé dans les zones méso-endémiques que les femmes au cours de leur seconde grossesse étaient aussi susceptibles que les primigestes (219).

Par ailleurs, le jeune âge de la mère (en particulier l'adolescence) est également un facteur de risque indépendant du paludisme pendant la grossesse. En effet, les jeunes primigestes et les multigestes sont plus exposées au risque de PAG et à ses conséquences néfastes que les primigestes ou les multigestes plus âgées, respectivement (220).

2.1.2 Pathogenèse du PAG

La sensibilité accrue des femmes enceintes à l'infection palustre est due, d'une part, à la séquestration des GRi par le *Plasmodium* dans le placenta. La séquestration placentaire est fréquente au cours de l'infection à *P. falciparum*. Des modifications placentaires au cours de certaines infections à *P. vivax* ont été rapportées mais aucune association avec la séquestration placentaire des GRi et les conséquences néfastes sur le fœtus n'a été démontrée (221,222). Par ailleurs, les modifications placentaires n'ont pas été signalées chez d'autres espèces.

La séquestration des *pfGRi* est médiée par la protéine dérivée du parasite VAR2CSA, exprimée à la surface des GRi et se liant au sulfate de chondroïtine placentaire A (CSA) sur le syndécan-1 (223). En effet, la perfusion de *pfGRi* dans un modèle de placenta non infecté entraînait la liaison des lignées parasitaires exprimant VAR2CSA, mais pas des autres lignées (224). Ce phénotype de liaison a été observé chez les parasites collectés au premier trimestre, ce qui suggère que les *pfGRi* circulants expriment VAR2CSA et se lient préférentiellement au CSA dès le début de la grossesse (225,226). VAR2CSA a plusieurs domaines de liaisons de type Duffy (DBL) et des régions inter-domaines (ID), parmi lesquels DBL-2, 3, 5 et 6 ont été associés à la liaison au CSA (227). La longueur et la sulfatation de la chaîne CSA sont indispensables et pourraient être déterminants pour le développement de stratégies thérapeutiques bloquant la séquestration (228).

Par ailleurs, la séquestration placentaire peut conduire à des réponses inflammatoires, notamment l'accumulation de monocytes dans le placenta. Cette observation est particulièrement fréquente chez les primigestes qui ont souvent une densité parasitaire élevée. L'inflammation placentaire a été associée à un retard de croissance fœtale et une anémie maternelle chez les femmes africaines, et à un faible poids de naissance en Papouasie Nouvelle Guinée (229,230). Des études suggèrent qu'en l'absence d'un traitement préventif intermittent (TPI), une inflammation placentaire pourrait commencer en début de grossesse et persister pendant des mois, et que 63% des infections placentaires auraient débuté à la fin du premier trimestre (231).

Le paludisme grave est facteur de risque peu fréquent de mortalité maternelle dans les régions d'Afrique où le paludisme est endémique (232). En effet, des études d'autopsie de femmes enceintes, ont révélé la séquestration massive de GRi dans les organes, y compris le cerveau et placenta (233). La séquestration simultanée de GRi dans les capillaires cérébraux et le placenta dans les cas mortels suggèrent que les infections pendant la grossesse pourraient consister en plusieurs populations de parasites avec divers phénotypes de liaison (234,235).

Une infection à *P. falciparum* en début de grossesse pourrait interférer avec l'invasion de trophoblastes dans l'utérus. Un modèle *in vitro* a montré que le plasma des femmes atteintes de paludisme inhibait la migration des trophoblastes extravilloux vers les artères spirales (236). Ceci engendre une altération du développement de la circulation placentaire chez la femme enceinte contribuant ainsi à la réduction de la croissance fœtale notée au début et en milieu de grossesse (237,238).

Le paludisme placentaire peut également affecter le développement de la circulation du fœtus, éventuellement par activation en cascade du complément, conduisant à une angiogenèse placentaire désordonnée. L'infection palustre occasionne une réduction de la taille du placenta, par des altérations similaires à l'angiogenèse placentaire pouvant affecter la croissance et le développement des villosités (239). Des troubles du transport des acides aminés et du glucose ont été également observés (240,241). Ces effets sont probablement induits par une augmentation de la libération de cytokines dans l'espace intervilloux (230). En effet, les cytokines inflammatoires peuvent altérer l'expression et la distribution des molécules de transport de nutriments et des hormones de croissance.

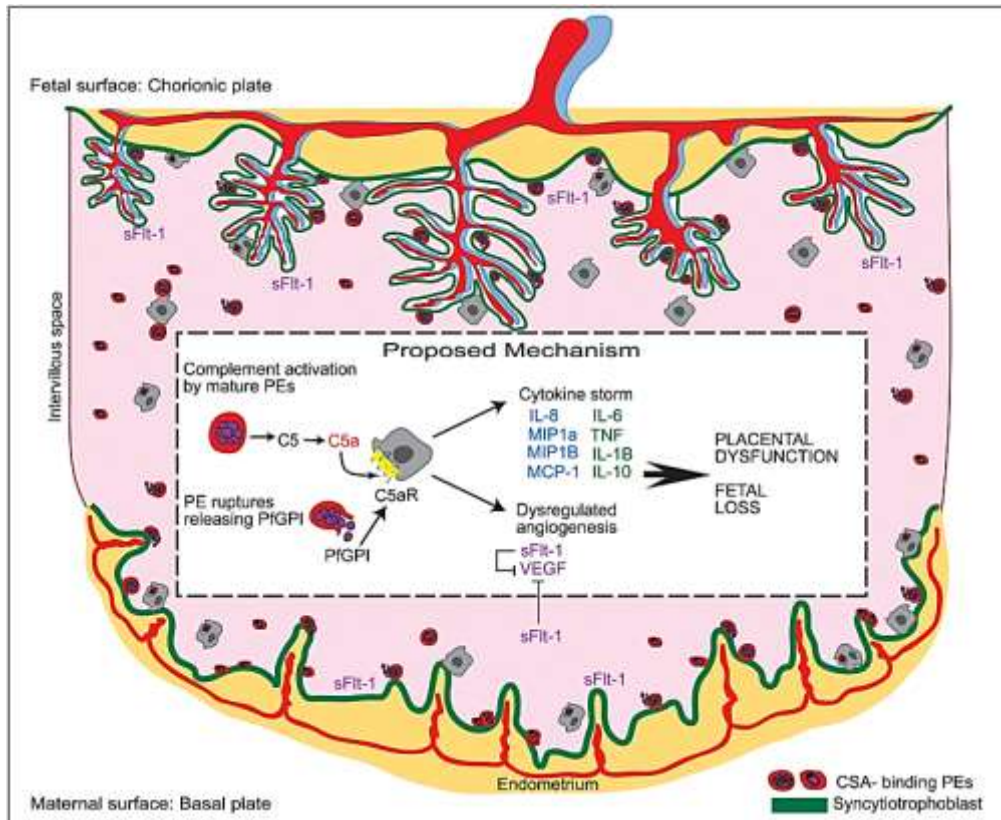


Figure 18 : Représentation schématique de l'environnement placentaire au cours du paludisme placentaire (242).

2.1.3 Diagnostic du PAG

Les principales options de détection de l'infection palustre chez les femmes enceintes sont la microscopie, les tests de diagnostic rapide par immuno-chromatographie (TDR), ou la PCR. L'histopathologie peut également permettre d'identifier les parasites et les réactions inflammatoires dans les échantillons placentaires. Elle permet de détecter à la fois les infections actuelles, actives et passées mais son coût limite son utilisation à la recherche. La microscopie n'est pas très sensible alors que les méthodes alternatives présentent des avantages et des limites.

L'utilisation de la PCR a permis d'améliorer l'identification du *Plasmodium* et a facilité les études sur de faibles densités parasitaires, permettant ainsi la détection des infections submicroscopiques. Ces infections sont généralement caractérisées par des densités parasitaires en dessous des limites de détection par les méthodes traditionnelles (243).

2.1.4 La lutte contre le PAG

La lutte contre le paludisme associé à la grossesse en Afrique est basée sur les recommandations de l'OMS s'articulant sur trois volets, comprenant la prise en charge des cas (traitement rapide avec un médicament très efficace), l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide et le traitement préventif intermittent (TPI) (244).

2.1.4.1 La prévention

Le traitement préventif intermittent pendant la grossesse consiste en l'administration d'un traitement à base de sulfadoxine-pyriméthamine (SP) lors de visites prénatales régulières, généralement à un mois d'intervalle à partir du deuxième trimestre de la grossesse. Actuellement, le TPI n'est recommandé qu'en Afrique. Une étude multicentrique montre que le TPI reste efficace contre le faible poids de naissance et l'anémie, même lorsque la résistance à la SP est élevée, ce qui est fréquent à l'est et au sud de l'Afrique(245). Dans les zones de faible transmission (comme l'Inde), peu de données sont disponibles concernant le bénéfice du TPI. Cependant, l'efficacité du TPI contre *P. vivax* et la faible absorption de la SP constituent des obstacles à la lutte (246).

Des essais réalisés en Afrique montrent l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide dans la prévention du paludisme et la réduction du faible poids de naissance et d'autres conséquences néfastes de la grossesse. La pulvérisation intérieure d'insecticide à effet rémanent est utilisée dans certaines régions d'Afrique et d'Asie, mais il existe peu de données sur son impact spécifique sur la grossesse (247).

2.1.4.2 Le traitement du PAG

2.1.4.2.1 Traitement du paludisme non compliqué au cours de la grossesse

Au cours du premier trimestre de la grossesse, le traitement du paludisme non compliqué recommandé par l'OMS est basé sur la quinine et la clindamycine (248). Dans de nombreux pays, la clindamycine n'est pas disponible et la quinine en monothérapie est prescrite. Les effets secondaires du traitement de sept jours avec la quinine, tels que les acouphènes, entraînent une mauvaise observance du traitement et un risque de recrudescence. Cependant, les CTA constituant une alternative à la quinine, leur innocuité n'a pas pu être établie au cours du premier trimestre(249).

Au cours des deuxième et troisième trimestres de grossesse, l'OMS recommande l'utilisation des CTA en première dans le traitement du paludisme non compliqué(248). Un essai comparant quatre CTA différentes à savoir l'artéméther-luméfántrine, l'amodiaquine-

artésunate, la méfloquine-artésunate ou la dihydroartémisinine piperaquine (DHA-PQ), pour le traitement du paludisme non compliqué au cours des deuxième et troisième trimestres de la grossesse, chez 3428 femmes enceintes, a montré des efficacités supérieures à 95% (250). Cependant, l'introduction de DHA-PQ en Papouasie et en Indonésie où *P. falciparum* et *P. vivax* étaient résistants à l'artéméter-luméfantrine, était associée à une diminution de l'infection palustre et de l'anémie maternelle, du paludisme congénital et du faible poids à la naissance (251).

Par ailleurs, pour le traitement du paludisme à *P. vivax*, la chloroquine reste efficace dans la majeure partie du monde, bien que la résistance apparue en Papouasie-Nouvelle-Guinée et en Indonésie se propage. Les CTA (à l'exception de l'artésunate-SP) sont également très efficaces pour le traitement du paludisme à *P. vivax*.

2.1.4.2.2 Traitement du paludisme sévère au cours de la grossesse

L'OMS recommande l'utilisation de l'artésunate parentéral pour le traitement du paludisme grave à tout moment de la grossesse (248). Le traitement peut être poursuivi avec un médicament oral approprié. De même l'artésunate parentéral est très efficace pour le traitement du paludisme sévère à *P. vivax* au cours de la grossesse (248).

2.2 Immunité au cours de la grossesse

Au cours de la grossesse, le système immunitaire de la mère connaît des modifications particulières (252). En effet, le fœtus est immunologiquement étranger à l'organisme maternel, ce qui nécessite des adaptations physiologiques pour empêcher le processus de rejet. Ainsi, des interactions immunologiques se déroulent au niveau des interfaces fœto-maternelles. Cependant, plusieurs mécanismes immunitaires et physiologiques sont mis en œuvre pour une adaptation à la greffe semi-allogénique que constitue le fœtus. Ils comprennent d'une part l'immunité innée et adaptative et d'autre part des hormones, des substances lipidiques et des cytokines capables de moduler le système immunitaire maternel.

2.2.1 Interfaces fœto-maternelles

Durant la gestation humaine, le fœtus lui-même, baignant dans le liquide amniotique, n'est pas en contact direct avec les tissus maternels. Seules les cellules trophoblastiques, dérivées du trophoctoderme, d'origine fœtale, sont en contact local direct et continu avec des cellules d'origine maternelle, sanguines ou utérines. Son génome étant pour moitié d'origine

paternelle, le fœtus peut présenter aux cellules effectrices du système immunitaire maternel des molécules du « non-soi » reconnues comme étrangères par la mère. Les interfaces fœto-maternelles, au nombre de quatre comprennent (253,254) (**Figure 19**):

- **Interface syncytiotrophoblaste / espace intervilleux sanguin maternel** : il s'établit un contact direct avec le sang maternel dès la douzième semaine.
- **Interface chorion** (constitué de cellules du cytotrophoblaste extravilleux) / **espace intervilleux sanguin maternel**
- **Interface cytotrophoblaste extravilleux** (endovasculaire) / **sang périphérique des artères spiralées maternelles**
- **Interface cytotrophoblaste extravilleux** (interstitiel, cellules placentaires géantes) / **decidua basalis** : il y a rencontre avec les effecteurs maternels de l'immunité. Cependant, la distribution des cellules maternelles dans la *decidua basalis* diffère de celle observée dans le sang périphérique : cellules NK (~ 70 %), cellules de type macrophagique CD14⁺ (~ 20 %), cellules dendritiques (~ 1 %), cellules T CD4⁺, y compris T régulatrices (~ 10 %), cellules T $\gamma\delta$, cellules NK tueuses, rares cellules T CD8⁺ et cellules B (253).

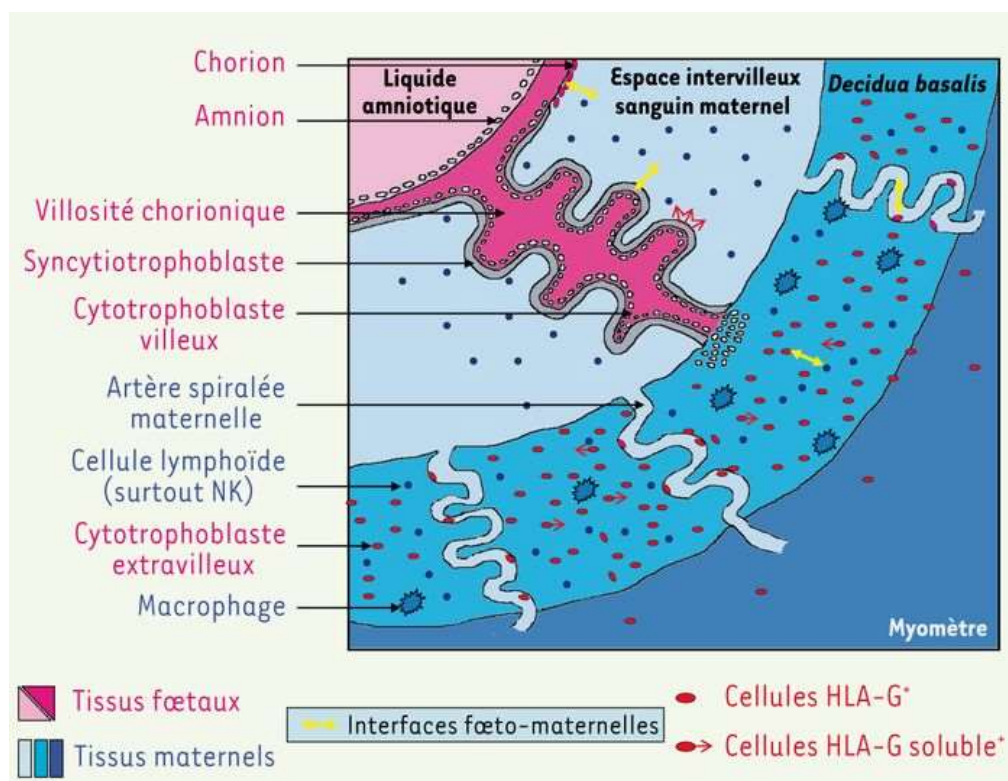


Figure 19. Représentation schématique du placenta humain au cours du premier trimestre de grossesse (253).

2.2.2 Mécanismes protecteurs mis en place

Lors de la grossesse, le fœtus, ou les différents types de cellules trophoblastiques, sont théoriquement les cibles potentielles des effecteurs humoraux et cellulaires de la réponse immunitaire de la mère. Le fœtus doit ainsi faire face à trois types de menaces potentielles provenant de la mère, et spécifiquement dirigées contre des antigènes paternels : les anticorps cytotoxiques fixant le complément, les cellules T CD8⁺ cytotoxiques et les cellules NK. En fait, le fœtus, en l'absence de toute pathologie ou infection, parvient à déjouer ces différentes menaces par la mise en place de mécanismes moléculaires protecteurs, spécifiques et transitoires (253).

- **Les anticorps cytotoxiques maternels dirigés contre le trophoblaste** : les cellules trophoblastiques n'expriment pas de molécule HLA de classe II. Cette absence d'expression prévient la stimulation des lymphocytes B, ainsi que celle des lymphocytes T CD4⁺. Aussi, les cellules B maternelles anti-paternelles sont partiellement délétées durant la gestation. Néanmoins, l'expression des molécules HLA de classe I d'origine paternelle a été mise en évidence chez environ 15 % des primipares et 75 % des multipares. Pour cela, l'inhibition de l'activation du complément par des molécules régulatrices permet la résistance du placenta humain à la lyse par les anticorps cytotoxiques maternels anti-paternels. Ainsi les protéines membranaires MCP et DAF s'opposent à la fixation du complément sur les immunoglobulines et favorisent son inactivation (255).
- **Les LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques d'antigènes HLA de classe I paternels** : les cellules trophoblastiques n'expriment pas les molécules les plus polymorphes HLA-A et HLA-B qui sont connues pour le rejet des allogreffes (256). Aussi, l'expression des molécules HLA-C à la surface des cellules du trophoblaste extravillieux est faible et les cellules T CD8⁺ spécifiques de HLA-C sont rarement observées après transplantation. Par ailleurs, il existe une sécrétion locale de molécules immunosuppressives, retrouvées localement au niveau des interfaces fœto-maternelles et permettant de contrôler l'activité des cellules T, mais également des NK : molécules HLA-G solubles, TGFβ, PIBF, enzyme indoleamine2,3-dioxygénase (IDO) et *Fas ligand* (CD95L). Les molécules *HLA-G* solubles, sécrétées à la fois par le cytrophoblaste extravillieux et le syncytiotrophoblaste (257), induisent l'apoptose des cellules T CD8⁺ activées en se fixant spécifiquement sur la molécule CD8 (258), ce qui pourrait expliquer le faible nombre de cellules T CD8⁺ au niveau de la *decidua basalis* (259). Le TGFβ, inhiberait

l'implantation embryonnaire (260). Le *progesterone-induced blocking factor* (PIBF), protéine anti-abortive induit la sécrétion de cytokines de type Th2 (261). L'IDO est une enzyme exprimée et sécrétée par le syncytiotrophoblaste en contact avec le sang maternel de l'espace intervilloux. Également exprimée par certains macrophages, elle catabolise le tryptophane en réponse à l'IFN- γ . Il en résulte une rapide déplétion du tryptophane et une inhibition subséquente de la prolifération des cellules T. Enfin, il se développe durant la gestation un état de tolérance transitoire et réversible des cellules T spécifiques des allo-antigènes paternels, présentes au niveau de l'espace intervilloux et de la *decidua basalis* (262).

- **Les cellules NK** : la grande majorité des cellules NK de la *decidua basalis* (dNK) possède un potentiel cytotoxique contrôlé. D'une part, la sous-population majoritaire de cellules dNK est CD56^{bright}/CD16⁻, phénotype non cytotoxique (contrairement au phénotype CD56^{dim}/CD16⁺, majoritaire dans le sang périphérique) ; d'autre part, et à l'inverse des cellules NK du sang périphérique, les cellules dNK ne polarisent pas vers la synapse cellulaire leurs centres d'organisation microtubulaires et leurs granules contenant de la perforine (263). Les cellules dNK expriment d'autres récepteurs : les récepteurs CD94/NKG2A (inhibiteur) et CD94/NKG2C (activateur), qui reconnaissent HLA-E ; les récepteurs ILT2 et KIR2DL4 (ayant des propriétés activatrices et inhibitrices), reconnaissent les formes solubles ou membranaires de HLA-G ; les récepteurs KIR activateur CD160, dont le ligand principal est HLA-C, exprimé par une sous-population minoritaire de DnK (264). Par ailleurs, les cellules trophoblastiques sont résistantes à la lyse par des cellules dNK mais également par des cellules NK du sang périphérique (265). L'absence de lyse des cellules du trophoblaste par les cellules dNK pourrait notamment être due à une très forte expression, au cours du premier trimestre de gestation, de la forme active de la molécule *x-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) (266), puissant inhibiteur des caspases. La molécule XIAP bloque la cascade apoptotique médiée par Fas dans les cellules trophoblastiques.

2.2.3 L'immunité lors de l'implantation du trophoblaste

Elle participe à la régulation de l'implantation du trophoblaste et au maintien de la grossesse.

Durant une grossesse normale, la décidue est colonisée par 20 à 30 % de macrophages. Au niveau de la décidue, les macrophages participent à la défense antibactérienne, au remodelage tissulaire et à la création d'un micro-environnement favorable au maintien de la

grossesse. Cette population reste stable tout au long de la grossesse et suggère une fonction importante dans l'implantation et le maintien de la grossesse. Les macrophages sont une source majeure de cytokines et de facteurs de croissance et contribuent à un équilibre favorable au maintien de la grossesse entre l'activité Th1 et Th2.

Lors de l'implantation, l'apoptose cellulaire est un mécanisme important de l'implantation du trophoblaste qui participe au remodelage des tissus. L'induction de l'apoptose des tissus concernés par l'invasion du trophoblaste est favorisée par des mécanismes tels que la réduction de l'expression de molécules d'adhésions (intégrine $\alpha 1 \beta 1$), la diminution d'activateur du plasminogène, l'absence d'expression de la cadhérine, la diminution de la production de métalloprotéases (MMP-9) et l'expression de HLA-G (267). L'apoptose cellulaire permet aux macrophages de phagocyter des débris cellulaires produits. Ainsi, au cours de la période péri-implantatoire, les composants du plasma sérial paternel influencent la production de chimiokines par l'endomètre qui activent l'immunité innée incluant les macrophages et les cellules NK. Cela entraîne la production de radicaux libres, une phagocytose des débris cellulaires et une activation de cytokines Th1 (IL-1 β et TNF- α) (268). Cette inflammation locale permet le nettoyage de la cavité utérine des cellules paternelles présentes et d'éventuels microorganismes, et permet la présentation des antigènes paternels aux cellules maternelles immunocompétentes. Elle entraîne une modification de la composition des leucocytes dans l'endomètre, active des facteurs angiogéniques, des facteurs de croissance et de métalloprotéinases capables de dégrader la matrice extracellulaire préparant l'endomètre à l'implantation de l'embryon (269). Dans la décidue les cytokines Th1 (IFN- γ , TNF- α et IL-2) activent les cellules NK et les lymphocyte activated killer (LAK) qui empêcheraient une prolifération excessive du trophoblaste(270). De plus, l'embryon est capable de sécréter de l'IL-2 qui stimule les cellules NK. Celles-ci, en coopération avec les macrophages qui produisent de l'INF- γ du TNF- α et de l'IL-12, induisent une apoptose des cellules trophoblastiques et permettent de restreindre la profondeur de l'invasion phoblastique (271). Cette activité Th1 initiale induirait, par les leucocytes endométriaux et l'embryon la production de cytokines Th2, de TGF- β et du LIF (Leukaemia inhibitory factor) permettant l'instauration secondaire locale d'un versant Th2.

2.2.4 Profil cytokinique gestationnel

Le profil cytokinique évolue en trois périodes au cours de la grossesse :

- **Le premier trimestre ou période inflammatoire de l'implantation** est caractérisé par un profil Th1 qui occasionne une réponse inflammatoire péri-implantatoire. A ce

stade, les cytokines pro-inflammatoires agissent comme des médiateurs du dialogue paracrine embryo-maternel associé à l'apposition, l'attachement et l'invasion (272). Dans ce processus, les cytokines membres de la superfamille de l'IL-6 sont nécessaires au stade précoce de l'implantation. D'autres cytokines telles que LIF exprimée à des concentrations élevées dans les glandes endométriales et fortement associée à une implantation normale, l'IL-11 agissant sur l'épithélium luminal de l'endomètre pour faciliter l'apposition et l'implantation des blastocystes sont produites (273). Le système IL-12/IL-15/IL-18 coopère avec le système IL-1 et d'autres cytokines telles que vascular endothelial growth factor (VEGF) et epidermal growth factor (EGF) via des interactions avec les leucocytes endométriaux et les cellules NK dans l'angiogenèse locale et le remodelage tissulaire(274). L'invasion des trophoblastes est favorisée par la production d'IL-8, de IFN-inducible protein (IP)-10, du VEGF et du facteur de croissance placentaire (275).

- **Le second trimestre ou période anti-inflammatoire** qui se distingue par une réponse cytokinique de type Th2. C'est la période de croissance et de développement du fœtus. Une fois l'implantation effectuée, la réussite de la grossesse est caractérisée par un équilibre des cytokines qui bascule vers une réponse de type Th2 prédominante. La progestérone contribue au maintien de la production d'IL-3, IL-4, IL-5 et IL-10 qui inhibent les réponses Th1 et favorisent la tolérance fœtale (276). De plus, chez les femmes enceintes en bonne santé, la production systémique d'IL-4, d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-13 augmente progressivement tandis que les taux sériques de la plupart des cytokines de type Th1 diminuent de manière significative au deuxième trimestre par rapport aux taux observés au cours du premier trimestre (277).
- **Le troisième trimestre ou période inflammatoire de l'expulsion** est caractérisée par un profil Th1. Pour expulser le fœtus et les annexes, une inflammation réapparaît pour induire les modifications cervicales, les contractions utérines et l'expulsion du placenta. L'IFN- γ et l'IL-1 β sont augmentées dans le sérum maternel. Les cytokines de type Th1 parallèlement à des stimulations mécaniques stimulent la production d'IL-8 et de prostaglandines qui sont directement impliquées dans la dilation du col et les contractions utérines. Ces phénomènes existent en dehors de toute infection (278).

2.3 Réponses immunitaires au cours du PAG

2.3.1 Réponses immunitaires cellulaires

Les mécanismes qui mènent à la maladie et à la mort pendant le paludisme gestationnel sont mal compris, mais la réponse inflammatoire dans le placenta a été liée à la fois à une anémie sévère chez la mère et à un poids faible chez le nouveau-né. Une importante infiltration des cellules immunitaires est souvent observée dans le paludisme placentaire et peut apparaître dans les espaces intervillositaires plusieurs jours après que les parasites commencent à s'accumuler dans le placenta. Les monocytes et les macrophages sont les composants cellulaires les plus distinctifs de l'infiltrat inflammatoire qui accompagne le paludisme placentaire, et apparaissent souvent grossièrement hypertrophiés et engorgés de pigment parasitaire (279). Parfois, les macrophages peuvent ingérer des GRi intacts. Les monocytes / macrophages peuvent phagocyter les GRi à la fois par des mécanismes d'opsonisation et non (280).

L'infiltrat placentaire comprend également couramment des lymphocytes et moins fréquemment des cellules polymorphonucléaires, mais les cellules (NK) semblent être absentes (281). La présence de monocytes placentaires et de macrophages a été associée à une anémie maternelle sévère et un faible poids de naissance dans de nombreuses populations (282). Les preuves actuelles suggèrent qu'en l'absence d'immunité spécifique, les parasites s'accumulent en grand nombre dans le placenta, induisant un infiltrat de cellules inflammatoires, accélérées par l'expression de chimiokines. Les cellules inflammatoires peuvent réduire la multiplication des parasites, mais sont inefficaces pour éliminer le parasite, ce qui favorise une réponse inflammatoire prolongée associée à des complications de la grossesse, à savoir le poids faible et l'anémie maternelle. L'acquisition d'anticorps spécifiques contre les parasites se liant au placenta peut faciliter l'élimination des parasites avant l'afflux de cellules inflammatoires, évitant ainsi la cascade d'événements menant à la maladie et à la mort.

Il est constaté que le processus d'acquisition de l'immunité contre le PAG ne commence que lorsque les femmes résidant dans une zone endémique deviennent enceintes, car l'immunité acquise précédemment ne protège pas contre l'infection maternelle et placentaire (283). Par conséquent, l'exposition répétée à des phénotypes parasitaires particuliers au cours de plusieurs grossesses peut entraîner un certain degré de protection. Dans ce processus, le placenta humain fournit au parasite un environnement immunitaire particulier qui induit un changement d'expression dans les gènes *var* dans le cas de *P. falciparum* et contribue à la sélection clonale des parasites exprimant le variant VAR2CSA observée chez les parasites placentaires (205). La nature variée des antigènes codés par ces familles de gènes rend les femmes enceintes très

susceptibles au paludisme et aux complications, indépendamment de l'étendue de l'exposition antérieure au parasite (284). Les niveaux d'anticorps contre les antigènes de surface des GRi se liant au placenta sont faibles avant la grossesse et augmentent avec les grossesses successives chez les femmes exposées à *P. falciparum* (285).

L'infection du placenta par le *Plasmodium* stimule la production de TNF- α et d'IFN- γ , IL1 β et d'IL-2 (286,287). Ces cytokines induisent la prolifération des LT et renforcent l'activité phagocytaire des macrophages par la production de dérivés réactifs de l'oxygène et l'oxyde nitrique (288). Par conséquent, on observe dans le placenta infecté de fortes réponses pro-inflammatoires visant à contrôler la prolifération du parasite. Bien que les facteurs dérivés des cellules jouent un rôle très important dans la réponse immunitaire contre le *Plasmodium*, leur surproduction pourrait constituer un risque pour le bon déroulement de la grossesse. De même, les cellules placentaires et fœtales exposées aux antigènes peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires, et compromettre le déroulement à terme de la grossesse (289). Ainsi, les principales sources d'IFN- γ au cours du paludisme gestationnel sont les LT CD8⁺, les LT CD4⁺, les cellules NK et le trophoblaste fœtal (290).

En général, des niveaux élevés d'IFN- γ sont associés à une protection contre le paludisme gestationnel (291). Des études préliminaires menées dans le nord-ouest de la Colombie ont confirmé que les placentas infectés aussi bien par *P. vivax* et par *P. falciparum* présentaient des taux élevés d'IFN- γ et de TNF- α alors que des taux élevés d'IFN- γ , ainsi que de TNF- α et d'IL1- β , étaient corrélés à des lésions placentaires dans les cas de paludisme placentaire (292). Il a été observé que le TNF- α exerce une double action importante lors de l'infection par le *Plasmodium*. D'une part, il est responsable de la plupart des symptômes cliniques et des complications du paludisme chez les patientes non enceintes et les femmes enceintes (293). D'autre part, il a des effets immunitaires car il favorise le recrutement des monocytes (294). Cependant, ce dernier phénomène pourrait être particulièrement délétère pour le placenta, en contribuant à l'évolution vers un statut pro-inflammatoire. L'évolution des taux de ces cytokines en association avec la parité s'est avérée variable (291,291). Dans les régions où différentes espèces *Plasmodium* sont endémiques, il a été observé que la réponse immunitaire à *P. falciparum* interfère avec les facteurs immunitaires observés dans le paludisme à *P. vivax* (295), comme le confirme l'immunité spécifique de souche et sérologique croisée entre les antigènes des stades sanguins des deux espèces (296). Néanmoins, la réponse à médiation cellulaire ne semble pas affectée, comme le montrent les études menées pendant la période de convalescence chez les hôtes infectés par *P. vivax*, confirmant ainsi une réponse spécifique des LT, qui réagissaient également aux antigènes de *P. falciparum* (297). Les études

sur l'équilibre Th1/Th2 du placenta dans des populations présentant différents degrés d'endémicité et selon les espèces infectantes sont de la plus haute importance car elles influencent un certain nombre d'autres réponses immunitaires, notamment le passage d'un isotype à un anticorps IgG cytophile.

2.3.2 Réponses anticorps spécifiques

2.3.2.1 Emergence de populations de parasites antigéniquement différents au cours de la grossesse

La variation antigénique de *P. falciparum* et d'autres espèces de *Plasmodium*, leur permet d'échapper aux réponses immunitaires entraînant la répétition et la persistance des infections (206). Cette propriété semble importante pour l'infection pendant la grossesse. Dans les zones d'endémie, les adultes non enceintes et les grands enfants qui possèdent généralement une immunité substantielle contre le paludisme, possèdent un grand répertoire d'anticorps agglutinants spécifiques des variants de différents isolats de *P. falciparum* marquant les expositions passées (298). Ces anticorps sont associés à la protection contre les infections et les formes cliniques chez les enfants (208). Cet aspect de l'immunité naturellement acquise semble être intact pendant la grossesse, car les femmes enceintes ont des anticorps spécifiques d'isolats de donneuses non enceintes (299).

Toutefois, au cours de la grossesse, de nouveaux variants antigéniques de *P. falciparum* émergent et sont mal reconnus par les anticorps acquis avant la première grossesse (299). Il a été montré que les anticorps capables d'inhiber l'adhésion au CSA ou de se lier à la surface des isolats placentaires ou des lignées parasitaires se liant au CSA sont rares chez ceux non exposés au paludisme placentaire dans différentes populations (299,300). L'émergence de nouveaux variants ou sérotypes parasitaires pendant la grossesse permettrait ainsi d'échapper à un aspect important de la réponse immunitaire acquise (4).

2.3.2.2 Immunité protectrice et acquisition d'anticorps

La sensibilité à l'infection par *P. falciparum* diminue au cours des grossesses successives, suggérant une réponse immunitaire acquise contre les variants de parasites qui infectent spécifiquement les femmes enceintes (300).

Les anticorps spécifiques des VSA de *PfGRi* peuvent être mesurés par plusieurs méthodes, en utilisant soit des isolats cliniques frais ou des isolats et des lignées de clones de parasites de laboratoire. Les différentes méthodes comprennent la mesure du degré d'inhibition de l'adhésion du parasite à des récepteurs ou cellules spécifiques, de la capacité d'agglutination

des GRi et de la réactivité aux VSA par immunofluorescence indirecte ou cytométrie en flux (299–301).

Après une exposition au paludisme pendant la grossesse, les femmes acquièrent des anticorps contre les antigènes de surface et les ligands de liaison au CSA exprimés par le *P. falciparum* placentaire (302). Les anticorps acquis au cours d'une grossesse persistent pendant les grossesses subséquentes où ils peuvent réduire le risque d'infection ou de complications (303).

Au cours de grossesses successives, les femmes résidant dans les zones d'endémie palustre de l'Afrique, la Thaïlande et la Papouasie-Nouvelle-Guinée acquièrent des anticorps capables d'inhiber l'adhérence du parasite au CSA et / ou qui réagissent avec la surface des parasites placentaires ou se liant au CSA (300,302,304). Lors d'essais avec des parasites placentaires frais, les anticorps anti-adhérence étaient uniformément absents dans les sérums prélevés chez des femmes primigestes infectées ou non au Kenya, alors qu'ils étaient rares mais pas absents chez les femmes primigestes au Malawi (300,305). Cependant, les essais avec des parasites sélectionnés pour l'adhésion au CSA et maintenus en culture prolongée *in vitro* chez les femmes primigestes ont démontré des niveaux plus élevés d'anticorps lors d'épisodes de paludisme placentaire (305). Par ailleurs, des études sur des femmes enceintes ont montré que les réponses anticorps spécifiques des GRi se liant au CSA étaient retardées chez les femmes primigestes par rapport aux femmes multigestes (306). L'acquisition d'anticorps contre les parasites placentaires a été liée à la protection contre le paludisme gestationnel. L'inhibition sérique de l'adhésion parasitaire à la CSA a été liée à une prévalence et une densité réduites de la parasitémie placentaire chez les femmes au Kenya et au Cameroun (300,303). Dans l'ouest du Kenya, les anticorps anti-adhérence chez les femmes au cours de leur deuxième grossesse étaient associés à une augmentation du poids de naissance et de l'âge gestationnel du nouveau-né, mais n'étaient pas associés à une augmentation du taux d'hémoglobine maternelle (307).

Des études prospectives sont nécessaires pour évaluer davantage le rôle et les spécificités d'anticorps dans l'immunité protectrice et d'examiner la contribution relative des anticorps inhibiteurs d'adhésion par rapport aux anticorps totaux contre les antigènes de surface (mesuré par cytométrie en flux ou test d'agglutination). Les différentes spécificités des anticorps mesurés par ces tests peuvent avoir différentes associations avec l'immunité protectrice et l'exposition. Alors que les anticorps anti-adhérence peuvent réduire la parasitémie en bloquant l'adhésion et la séquestration, les anticorps agglutinants peuvent également interférer avec l'adhésion du parasite, bien que les parasites placentaires s'agglutinent mal par rapport aux isolats prélevés chez des individus non-enceintes (299,300). Toutefois, les

anticorps réagissant contre la surface des GRi sans inhiber l'adhérence pourraient encore limiter la parasitémie en opsonisant les parasites pour favoriser la phagocytose et la lyse. Une combinaison de types d'anticorps pourrait éventuellement être plus efficace pour limiter le paludisme placentaire.

2.3.3 Cytokines et chimiokines

Les cytokines et les chimiokines jouent très probablement un rôle clé dans la genèse de la réponse inflammatoire et des complications cliniques. Les concentrations placentaires de chimiokines β et α augmentent pendant le paludisme et pourraient favoriser l'afflux de cellules immunitaires dans le placenta. Le *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α et β , le *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 et IL-8 sont augmentées dans l'infection placentaire et leurs niveaux sont corrélés à la densité des monocytes (286,289,308). En outre, l'expression du récepteur de chimiokine CCR5 sur les macrophages infiltrants joue un rôle important dans la pénétration de l'infiltrat inflammatoire. Le bon déroulement de la grossesse est favorisé par des cytokines anti-inflammatoires ou de type 2 (287). Au contraire, des concentrations placentaires élevées de cytokines inflammatoires, y compris TNF- α , IFN- γ et IL-2 ont été systématiquement associés au paludisme placentaire dans différentes populations (287,309–312). Durant les épisodes de paludisme placentaire, le TNF- α et l'IL-8 sont produits par les macrophages infiltrants, tandis que l'IFN- γ peut provenir en partie des villosités choriales du tissu placentaire (309). Une anémie maternelle sévère et / ou un faible poids de naissance ont été liées au TNF- α , à l'IFN- γ et à l'IL-8 (287,310). Cependant, une production élevée d'IFN- γ par les leucocytes intervillositaires a été observée chez des femmes multigestes non infectées, suggérant peut-être un rôle protecteur pour l'IFN- γ (291). Dans les zones de transmission stable, l'association entre les cytokines inflammatoires et les complications de la grossesse semble être la plus forte chez les femmes primigestes, qui souffrent de manière disproportionnée de paludisme et de complications liées au paludisme. Cela peut être dû non seulement à la chronicité de l'infection et aux réponses cytokiniques prolongées observées dans ce groupe mais également à l'absence des IgG anti-VAR2CSA (287).

2.4 Conséquences du PAG

Le paludisme associé à la grossesse peut entraîner une série de complications, et l'impact du paludisme pendant la grossesse semble dépendre de l'intensité et de la stabilité de la transmission, du niveau d'immunité préexistante et de la gestité (313). Dans les zones de forte transmission du paludisme, l'anémie maternelle et le faible poids de naissance sont

fréquents, tandis que dans les zones de faible endémicité, les avortements spontanés, les décès à la naissance, la prématurité et les maladies maternelles graves sont plus fréquents (313).

2.4.1 Conséquences chez la mère

L'accumulation de GRi dans les espaces sanguins du placenta est une caractéristique clé de l'infection maternelle à *P. falciparum*. La densité de l'infection dans le placenta peut être importante, avec plus de 50% des GRi dans certains cas, et dans les zones de transmission stable, les infections à densité élevée sont plus fréquentes chez les femmes primigestes (313,314). La parasitémie placentaire est généralement plus élevée que celle observée dans le sang périphérique, et peut être observée en l'absence de parasitémie sanguine périphérique détectable (315). Chez les femmes non immunisées, telles que les voyageurs ou les victimes d'épidémies de paludisme, la grossesse augmente la morbidité et la mortalité dues au paludisme. Les syndromes sévères, tels que le paludisme cérébral, l'anémie sévère et la détresse respiratoire, sont fréquents et fatals (313). Cependant, chez les femmes immunisées vivant dans des zones de transmission stable, le paludisme est un facteur important de la prévalence et de la sévérité de l'anémie pendant la grossesse. L'anémie augmente par conséquent l'incidence des décès maternels pendant la grossesse ou le post-partum et est associée à une augmentation de la mortalité fœtale et infantile, à la prématurité et au faible poids de naissance (316).

2.4.2 Conséquences chez le fœtus

Le faible poids de naissance, principale complication du paludisme maternel, est le plus grand facteur de risque de mortalité et de morbidité infantiles (317). Le retard de croissance fœtale et la prématurité contribuent à réduire le poids à la naissance des nouveau-nés issus de grossesses exposées au paludisme (318). Dans les zones où les niveaux de transmission du paludisme sont stables et élevés, le faible poids de naissance résulte principalement d'un retard de croissance plutôt que de la prématurité, alors que dans les contextes d'endémicité instable, la prématurité est un marqueur du paludisme gestationnel. Le paludisme gestationnel a été associé à une anémie chez les nouveau-nés (313). Les nouveau-nés naissent rarement avec une parasitémie patente, ce qui rend peu probable que l'anémie fœtale soit directement due au paludisme. De nombreux rapports de cas de paludisme congénital ont établi que ce syndrome se produit, bien que la fréquence avec laquelle il survient reste controversée. Alors que certains rapports affirment que la parasitémie du sang de cordon est une complication courante de l'infection maternelle, la plupart des rapports ont montré que le paludisme congénital est rare chez les femmes immunisées dans les zones de transmission stable du paludisme (319).

Toutefois, le paludisme congénital peut entraîner un paludisme grave et la mort, mais l'infection et la maladie pendant la période néonatale peuvent être limitées en raison des anticorps maternels transférés par le placenta, de l'activation du système immunitaire fœtal par l'infection palustre maternel pendant la gestation, et d'une prédominance de l'hémoglobine F chez les nouveau-nés (320).

CHAPITRE 3 : PAMVAC, un candidat vaccin contre le PAG

3.1 Développement d'un vaccin contre le PAG

3.1.1 La protéine VAR2CSA

L'adhésion de *Pf*GRi à la CSA est médiée par la protéine VAR2CSA de 350 kD (**Figure 20**), un membre de la famille des antigènes variants de surface *Pf*EMP1. Les protéines *Pf*EMP1, y compris VAR2CSA, sont codées dans le génome de *P. falciparum* mais pas dans celui des autres *Plasmodium* infectant l'homme. VAR2CSA possède des régions extracellulaires, transmembranaires et intracytoplasmiques. La région extracellulaire présente une structure unique et comprend une séquence N-terminale, 6 domaines de type Duffy (DBL) riches en cystéine et des régions interdomaines (ID) qui jouent un rôle important dans l'adhésion et l'immunogénicité des fragments de protéine VAR2CSA recombinante. VAR2CSA est préférentiellement exprimé par des parasites placentaires et des isolats sélectionnés pour se lier au CSA, et est actuellement le principal candidat pour un vaccin contre le PAG(321,322). Le poids moléculaire élevé, les multiples domaines extracellulaires et la variation de séquence de VAR2CSA constituent des obstacles dans la conception d'un vaccin qui imitera l'activité neutralisante de l'immunité naturellement acquise. Les 2 premiers candidats à base de VAR2CSA dérivés de la région N-terminale de la protéine ont terminé la Phase I des essais cliniques.



Figure 20 : Organisation schématique de la protéine VAR2CSA (323).

3.1.2 Identification de candidats vaccins à base de VAR2CSA

VAR2CSA est le principal candidat vaccin contre le PAG. Différentes approches de recherche ont été adoptées pour identifier les épitopes qui devraient être inclus dans un vaccin à base de cette protéine. Elles comprennent la cartographie des sites de liaison au CSA, la cartographie des épitopes d'anticorps, la définition des domaines DBL préférentiellement reconnus par les sérums immuns et l'évaluation de l'activité fonctionnelle des anticorps dirigés contre les différents domaines DBL recombinants. Alors que plusieurs domaines VAR2CSA se lient à CSA dans des tests *in vitro*, le fragment N-terminal (ID1 – DBL2 – ID2a – ID2b) se

lie à la CSA avec une cinétique similaire à celle de la protéine entière(324). Cependant chez les animaux, les anticorps induits contre le domaine multiple NTS – DBL1 – ID1 – DBL2 – ID2a ont une activité fonctionnelle hétérologue, et l'activité sérique induite par cette forme recombinante a été plus large que celle induite par le plus petit fragment ID1 – DBL2 (325,326).

3.1.3 Le candidat vaccin PAMVAC

Le vaccin PAMVAC est un vaccin sous-unité à base de la protéine VAR2CSA. L'objectif de la vaccination avec PAMVAC est d'empêcher le développement de complications et de réduire tout effet du PAG sur le fœtus et la santé de la mère. La grande taille et la structure complexe de la protéine VAR2CSA empêchent la fabrication à grande échelle de la protéine entière avec les technologies actuelles. Par conséquent, un plus petit fragment de VAR2CSA qui a la capacité d'induire des réactions croisées d'anticorps inhibiteurs fonctionnels a été choisi comme antigène vaccinal. Le profilage systématique des anticorps naturellement acquis contre des fragments de VAR2CSA a conduit à la découverte du polypeptide ID1-ID2a de 383 à 1025 acides aminés du VAR2CSA de la souche FCR3. Il englobe le domaine DBL2X, qui, dans des modèles animaux, induit des anticorps fonctionnels bloquant l'adhésion qui ciblent une région de liaison CSA (324). L'efficacité inhibitrice moyenne du polypeptide est comparable à l'efficacité d'inhibition obtenue avec des anticorps issus de femmes immunisées multigestes (327). ID1-ID2a a donc été sélectionné pour un développement clinique ultérieur et constitue l'antigène du vaccin PAMVAC. Ainsi, l'immunisation des rongeurs avec l'antigène PAMVAC recombinant (73 kDa) induit des anticorps bloquant l'adhésion avec une activité transcendant la souche (328).

Le développement d'un vaccin contre le PAG est basé sur l'immunité naturelle. Sur la base de ce modèle, le vaccin devrait induire des anticorps chez les femmes nulligestes qui seront boostés au cours des grossesses ultérieures par les expositions au *Plasmodium*, et devrait de même, renforcer les anticorps fonctionnels qui ont été acquis par les multigestes dans les zones endémiques. Dans ce contexte, l'étude de la construction naturelle de la mémoire spécifique de la protéine VAR2CSA, a montré une augmentation de la fréquence des cellules B mémoires stimulées par l'antigène vaccinal PAMVAC chez les femmes infectées au cours de leur première grossesse (329).

DEUXIEME PARTIE : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS
DE THESE

Chaque année, environ 25 millions de grossesses sont à risque d'infections palustres placentaires en Afrique subsaharienne (330). En zone de forte transmission, la prévalence des infections placentaires est élevée. On estime qu'environ une femme enceinte sur quatre présente une infection placentaire à l'accouchement. En effet, le PAG constitue un problème de santé publique majeur, particulièrement en Afrique sub-saharienne de par sa sévérité et la présence d'une anémie en plus des répercussions sur le développement fœtal, à savoir l'avortement spontané et le faible poids de naissance. Cependant, au cours de la grossesse, l'infection est souvent asymptomatique mais elle peut conduire à différents syndromes résultant de l'expression des antigènes dérivés du *Plasmodium* à la surface des érythrocytes infectés et leur adhérence et séquestration au niveau du placenta. La localisation de l'infection au niveau placentaire pose un problème de diagnostic et retarde la prise en charge. Des conséquences fatales pour la mère et le fœtus peuvent apparaître.

Un rôle important des cytokines dans l'apparition des complications a été décrit. En effet, la dualité d'implication des cytokines est liée d'une part à la tolérance de l'allogreffe fœtale assurée par la balance cytokinique gestationnelle et d'autre part à l'altération de cet équilibre par l'infection palustre. Cependant, la plupart des travaux se sont concentrés sur les profils des cytokines à l'accouchement. Ainsi des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α étaient associées à l'apparition d'une anémie sévère, d'un retard de croissance intra-utérin et à un faible poids de naissance (287). Les connaissances sur les réponses immunitaires périphériques, issues d'études longitudinales permettant la détermination des marqueurs immunologiques de diagnostic et de pronostic au niveau périphérique, sont insuffisantes. Pour cela dans la première partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés au profil des cytokines au niveau périphérique et leur intérêt pour le diagnostic et le pronostic de l'infection palustre et ses complications au cours de la grossesse et à l'accouchement.

Cependant, en dehors du diagnostic, les difficultés d'accès aux soins et l'émergence de résistance aux moyens de prévention comprenant l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) et le traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPI) limitent l'efficacité de la stratégie de lutte recommandée par l'OMS.

L'introduction d'un vaccin prévenant le paludisme placentaire permettra de réduire la mortalité et la morbidité de la mère et du nouveau-né et pourra compléter les autres mesures de prévention du PAG et de ses complications ainsi que le vaccin antipaludique ciblant les stades sanguins pré-érythrocytaire asexués. Ainsi, le développement d'un vaccin efficace pour prévenir le paludisme placentaire améliorera la santé de deux groupes vulnérables importants et permettra de réduire considérablement le fardeau que constitue le paludisme.

PAMVAC, un candidat vaccin contre le PAG à base de VAR2CSA a été mis au point. Les essais précliniques dans des modèles animaux ont montré que le candidat vaccin PAMVAC induit des IgG capables d'inhiber l'adhésion des érythrocytes infectés par des parasites homologues à la CSA *in vitro* et peuvent également provoquer des réactions croisées par inhibition de l'adhésion des érythrocytes infectés par d'autres souches de parasites à la CSA placentaire (324,326,331). De plus, la protection acquise naturellement contre le paludisme placentaire est corrélée à des taux élevés d'IgGs anti-VAR2CSA et à l'induction d'une réponse humorale mémoire(332). L'objectif d'un vaccin efficace contre le PAG est donc l'induction d'une réponse anticorps protectrice et durable. Dans ce contexte, la deuxième partie de nos investigations a étudié l'immunogénicité du candidat vaccin PAMVAC à travers la quantification des cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal, la mesure des taux de cytokines produites en réponse à la stimulation antigénique *in vitro* avec l'antigène vaccinal et la détermination des phénotypes des cellules T et B mémoires induites par le vaccin chez des femmes nulligestes béninoises au cours d'un essai clinique de Phase Ib.

Par ailleurs, le mécanisme ciblé par le candidat vaccin PAMVAC en vue de prévenir le PAG est en plus de l'induction d'anticorps interférant avec l'adhésion au placenta de souches homologue et hétérologue, l'opsonisation des érythrocytes infectés par ces souches et leur phagocytose pour élimination par la rate. En effet, des études sur la fonctionnalité des anticorps suggèrent des différences de fonctionnalité des anticorps pouvant être liées à une expression variable d'épitopes entre les souches (333). Il est donc important d'intégrer la notion de réactivité croisée dans le développement d'un vaccin efficace. Dès lors, dans la troisième partie de nos travaux nous avons analysé la fonctionnalité des anticorps dirigés contre des érythrocytes infectés par des souches de *Plasmodium* adhérant à la CSA placentaire. Il s'agit particulièrement de l'évaluation de taux d'anticorps reconnaissant spécifiquement des érythrocytes infectés par des souches, homologue et hétérologue à la souche FCR3 du vaccin, adhérant à la CSA et le pourcentage de phagocytose de ces érythrocytes infectés médiée par les anticorps de volontaires sains issus de deux zones d'endémicité (exposés et non exposés) au cours d'un essai clinique de Phase Ia et b.

Les résultats issus de nos investigations fournissent des données permettant d'améliorer l'immunogénicité du candidat vaccin PAMVAC ayant terminé la Phase I des essais cliniques en vue de la poursuite de son développement en Phase II.

TROISIEME PARTIE : CADRES ET METHODES DES
ETUDES

Organisation de la thèse

La présente thèse s'est déroulée en cotutelle entre les universités d'Abomey-Calavi (Bénin) et de Paris (France). Un financement de 38 mois obtenu auprès de la Banque Islamique de Développement a permis la réalisation des travaux en alternance au sein de trois institutions de recherche :

- L'Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Abomey-Calavi, Bénin
- L'UMR 261, Mère et enfant en milieu tropical : pathogènes, système de santé et transition épidémiologique
- Peter Doherty Institute, Melbourne, Australie.

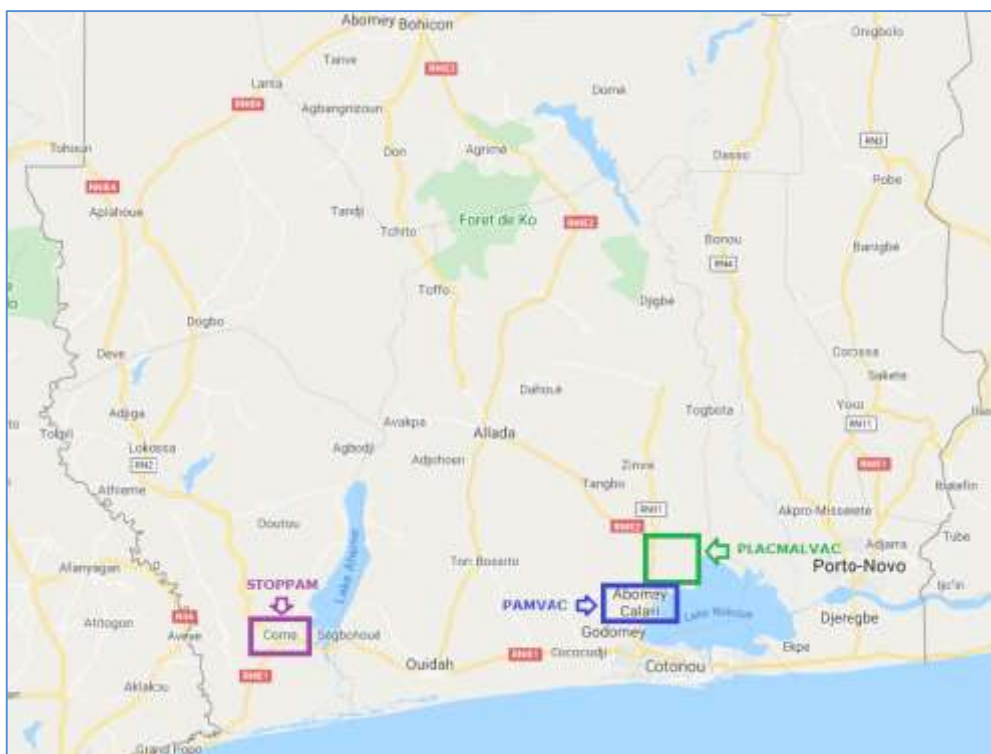


Figure 21. Délimitation des sites d'étude STOPPAM, PLACMALVAC et PAMVAC.

CHAPITRE 1: Etude retrospective longitudinale sur la cohorte STOPPAM de femmes enceintes

Pour atteindre le premier objectif de nos investigations, nous avons mené une étude rétrospective sur des échantillons issus du suivi longitudinal d'une cohorte de femmes enceintes du projet STOPPAM.

1.1 Description du projet STOPPAM

Le projet STOPPAM 'Strategies To Prevent Pregnancy-Associated Malaria', est un consortium de six pays (France, Danemark, Hollande, Suède, Bénin et Tanzanie) dont l'objectif était de conduire une étude chez les femmes enceintes et leurs nouveau-nés afin d'évaluer les effets du PAG et d'identifier un candidat vaccin contre le PAG. Pour atteindre cet objectif, deux études de cohorte ont été menées au Bénin et en Tanzanie. Le projet financé par l'Union Européenne a obtenu l'avis des comités éthiques de chaque pays.

Au Bénin, l'étude s'est déroulée de Juin 2008 à Septembre 2010 dans la commune de Comè située à 70 kilomètres (km) à l'ouest de Cotonou, la capitale économique du Bénin (**Figure 21**). Les femmes portant une grossesse d'âge gestationnel inférieur à 24 semaines, vivant dans un périmètre de 15 km d'un dispensaire et planifiant d'accoucher à l'hôpital ont été incluses dans trois dispensaires : Comè, Akodeha et Ouèdèmè-Pédah après un consentement éclairé et signé. Un suivi longitudinal a été réalisé sur 1037 femmes et consistait en la collecte des données cliniques, parasitologiques, anthropométriques et des échantillons biologiques à l'inclusion, à chaque consultation prénatale (CPN), en consultation d'urgence et à l'accouchement. A chaque CPN, une dose de sulfadoxine-pyriméthamine (SP) était administrée en traitement préventif intermittent (TPI) à au moins 1 mois d'intervalle au deuxième trimestre de grossesse sous la surveillance de sages-femmes jusqu'à l'accouchement. Toute participante présentant une fièvre (température axillaire $\geq 37,5^\circ$) et une infection palustre diagnostiquée par TDR recevait une dose de traitement de quinine, ou de SP s'il s'agissait de la visite prévue pour la prise de TPI. Dans ce cas, un contrôle basé sur un frottis sanguin était réalisé 7 jours plus tard. En cas de symptômes cliniques entre les CPN, les femmes étaient invitées à se rendre dans les établissements de santé pour obtenir un traitement. Les mêmes informations cliniques et biologiques étaient collectées pendant ces CPN. Quatre échographies ont été réalisées et ont permis de déterminer le terme exact de la grossesse et d'évaluer la croissance et la morphologie fœtale. Les données des femmes ayant accouché en dehors du cadre de l'étude ont été collectées à partir du carnet de soins prénatals.

Les TDR, gouttes épaisses, frottis sanguins et échantillons de sang des trois centres de santé étaient collectés, conservés à 20°C et envoyés dans un délai de 4 heures au laboratoire. Les échantillons de sang prélevés sur anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Adénine (CPDA) ont été centrifugés et congelés à -80°C au laboratoire du Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE) de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou pour des analyses immunologiques.

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés à un sous-groupe de 400 femmes disposant des données cliniques, parasitologiques et biologiques (plasma) à l'inclusion, à la CPN4 et à l'accouchement (**Figure 22**). Notre objectif était de déterminer le profil des cytokines et leur intérêt pronostic ou diagnostique en rapport avec le paludisme et ses complications dans les échantillons de plasma périphérique. Dans ce contexte, nous avons définis 4 groupes de femmes :

- i- les femmes ayant eu une infection à *P. falciparum* pendant la grossesse
- ii- les femmes ayant eu une anémie pendant la grossesse
- iii- les femmes ayant donné naissance à des bébés prématurés (PTB)
- iv- les femmes qui ont accouché des bébés présentant un faible poids pour leur âge gestationnel (SGA).

Le diagnostic de l'infection à *P. falciparum* était effectué systématiquement à chaque CPN pendant la grossesse et était définie par une goutte épaisse positive après un examen microscopique du sang périphérique. L'anémie maternelle était évaluée à chaque CPN et définie comme un taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dl. Les bébés PTB étaient ceux nés à un âge gestationnel inférieur à 37 semaines, tel que défini par l'échographie menée avant 24 semaines d'aménorrhée. Les bébés SGA étaient ceux présentant un retard de croissance fœtale classés selon les tableaux spécifiques au sexe pour les poids à la naissance inférieurs au dixième centile du poids fœtal pour l'âge gestationnel. Les échantillons provenant de patients VIH séropositifs confirmés n'ont pas été utilisés dans cette étude.

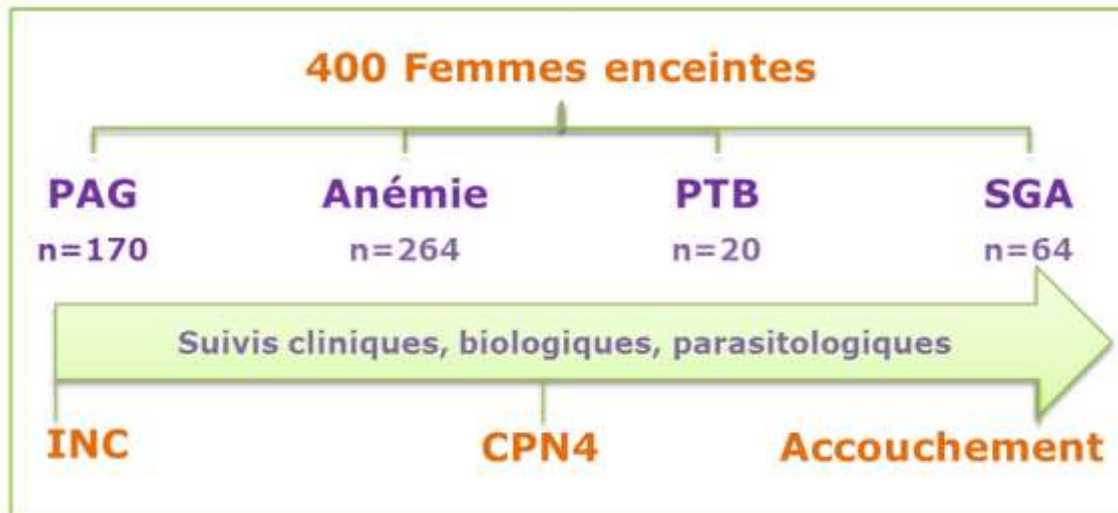


Figure 22 : Suivi longitudinal d'une sous cohorte de l'étude STOPPAM.

1.2 Etude des profils de cytokines au cours de la grossesse chez des femmes béninoises exposées au paludisme

Les échantillons de plasma prélevés à l'inclusion (INC), CPN4 (4 mois après l'inclusion), et à l'accouchement, conservés à -80°C et sélectionnés pour la présente étude ont été décongelés à température ambiante. Les plasmas des 400 femmes enceintes ont ensuite été testés pour la détermination du profil des cytokines. Les concentrations des cytokines anti-inflammatoires IL-4, IL-5, IL-10 et pro-inflammatoires IL-12p70 et IFN- γ ont été mesurées simultanément dans 50 μl de plasma à l'aide de la technologie Cytometric Bead Array (CBA) enhanced sensitivity (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) conformément aux instructions du fabricant. Les données ont été acquises par la technique de cytométrie en flux (BD FACS Calibur) et analysées à l'aide du logiciel FCAP Array version 1 (BD, Soft Flow Hongrie) pour la détermination des concentrations des cytokines mesurées. Les limites de détection étaient de 0,072 pg/ml, 0,034 pg/ml, 0,007 pg/ml, 0,006 pg/ml et 0,007 pg/ml respectivement pour IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70 et IFN- γ (**Figure 23**).

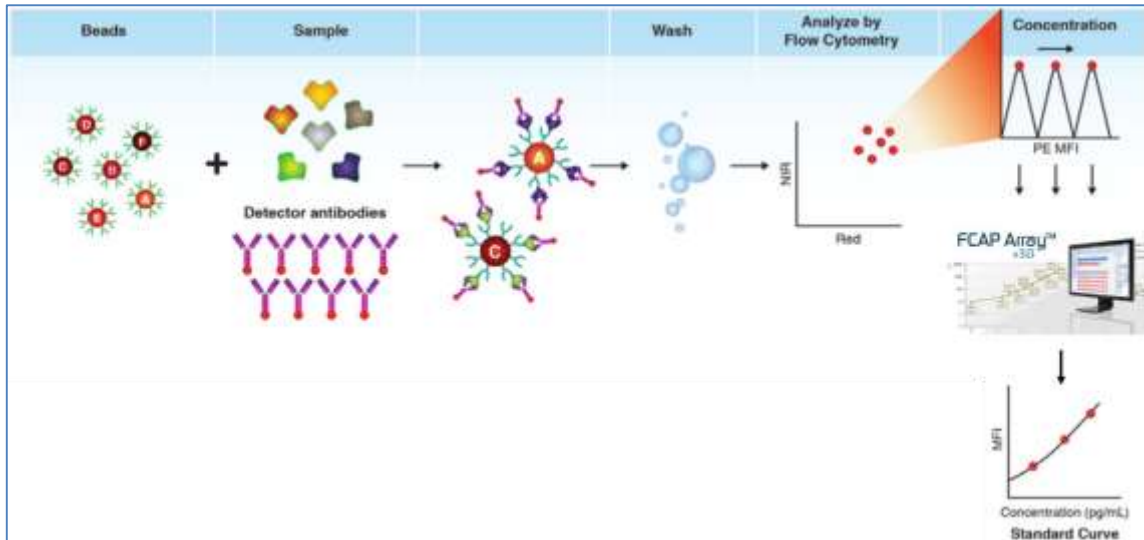


Figure 23 : Principe du dosage des cytokines par la technologie CBA (334).

CHAPITRE 2 : Quantification des réponses mémoires naturelles et celles induites par le candidat vaccin PAMVAC

2.1 Projet PlacMalVac

Le projet PlacMalVac faisant suite au Projet STOPPAM est né du consortium africain (Bénin) et européen (Allemagne, Danemark, France). Il a été financé par l'Union Européenne et avait pour objectif principal, le développement clinique d'un vaccin contre le PAG. Dans ce contexte, une partie de VAR2CSA, l'antigène du candidat vaccin PAMVAC a été sélectionné et testé. Une cohorte de femmes nulligestes vivant dans la zone rurale des communes de Sô-Ava et Zè (**Figure 21**) a été suivie afin d'étudier la faisabilité d'un essai clinique de Phase II chez des femmes béninoises non enceintes et l'acceptabilité d'un vaccin contre le PAG au Bénin. Des tests de grossesse étaient réalisés mensuellement en plus du suivi clinique et parasitologique. Des échantillons de 20ml de sang veineux prélevés chez ces femmes étaient envoyés dans un délai de 4 heures au laboratoire du CERPAGE pour les analyses hématologiques, biochimiques, parasitologiques et pour l'isolement et la congélation des CMN en vue des analyses immunologiques. Dans nos investigations, nous nous sommes intéressés à une sous-cohorte de 17 femmes nulligestes (**Figure 24**) sélectionnées à partir de la cohorte pour lesquelles nous disposons des échantillons biologiques (CMN) et des données cliniques et parasitologiques aux 4 temps du suivi longitudinal : l'inclusion (M1), le cinquième mois de grossesse (M5), l'accouchement (M9) et 6 mois après l'accouchement (M15). L'objectif du travail présenté ici était d'analyser le phénotype associé à la construction de la mémoire cellulaire en réponse à l'infection naturelle à *P. falciparum* pendant la première grossesse.

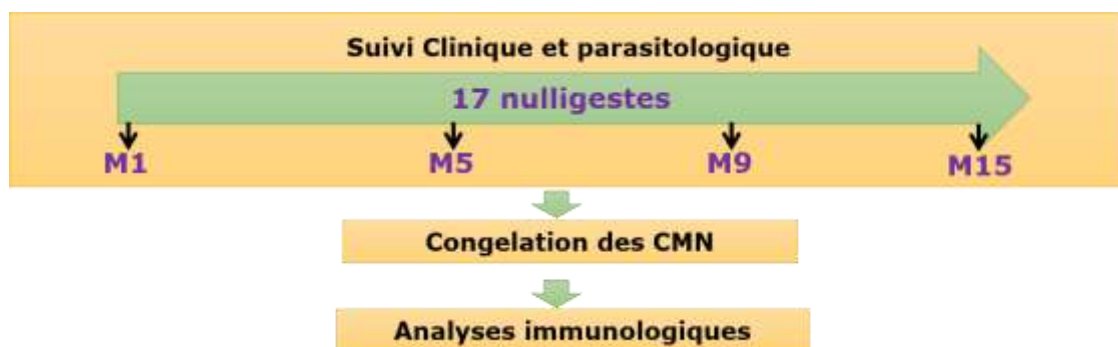


Figure 24 Schéma représentatif du suivi longitudinal de la sous-cohorte de l'étude à Sô-Ava.

2.2 Etude PAMVAC

2.2.1 Description de l'étude PAMVAC

Le projet PAMVAC 'Pregnancy Associated Malaria Vaccine' fait partie du projet PlacMalVac et s'intègre dans l'objectif du développement clinique d'un vaccin contre le PAG. Ce projet vise à étudier l'innocuité et l'immunogénicité du candidat vaccin PAMVAC destiné à protéger les mères et leur fœtus contre le paludisme placentaire et ses complications. Il est financé par l'Union européenne et consiste en un essai clinique de Phase I réparti sur deux sites. Le projet s'est réalisé en deux étapes :

- i- La Phase Ia, en Allemagne du 4 Mai 2016 au 9 Mars 2017, constituait la première administration à l'homme. Une injection intramusculaire de 20 à 50 µg de PAMVAC avec un adjuvant Alhydrogel, GLA-SE ou GLA-LSQ était réalisée chez des adultes naïfs de paludisme, en bonne santé et vivant en Allemagne.
- ii- La Phase Ib, dans une zone d'endémie palustre au Bénin, et portant sur le groupe cible, était randomisée, en double aveugle avec essai de la dose cible du 2 Novembre 2016 au 16 Août 2017. Au cours de cette étape, une dose de 50 µg de PAMVAC avec un adjuvant Alhydrogel ou GLA-SE était administrée à des femmes nulligestes vivant au Bénin. Un groupe de femmes représentait également le groupe contrôle recevant un placebo comprenant une solution saline physiologique.

Tous les participants du projet ont reçu trois injections intramusculaires à intervalle de quatre semaines. Chaque augmentation de dose était conditionnée par une évaluation positive de l'innocuité par un comité indépendant de surveillance de l'innocuité et une approbation du sponsor. Un individu de chaque combinaison PAMVAC-adjuvant servait de sentinelle en recevant la vaccination un jour avant le reste du groupe.

Nos travaux sont intégrés dans les objectifs exploratoires d'étude de l'immunogénicité du candidat vaccin PAMVAC. Il s'agissait spécifiquement pour nous de caractériser le phénotype de la mémoire cellulaire induite par la vaccination avec le candidat vaccin PAMVAC.

2.2.2 Echantillonnage

Il s'agit du premier essai du concept qui a permis d'étudier la tolérance et l'immunogénicité. L'étude a reçu l'accord du comité d'éthique de chaque site de l'essai. Au total, 57 volontaires ont été inclus sur les deux sites de l'essai après signature d'un

consentement éclairé (**Figure 25**). En Allemagne, l'étude a été menée à l'Université de Tübingen où 36 volontaires adultes, naïfs ont été recrutés. Parmi eux, 9 participants ont reçu la dose de 20 µg de PAMVAC avec un adjuvant (Alhydrogel ou GLA-SE ou GLA-LSQ) alors que 3 volontaires recevaient la dose de 50 µg de PAMVAC avec un adjuvant (**Figure 25**).

Au Bénin, l'étude s'est déroulée à l'Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB) en collaboration avec le CERPAGE et l'UMR261 MERIT de l'IRD. La dose cible de 50 µg était administrée à 9 participantes avec un adjuvant (Alhydrogel ou GLA-SE) tandis que 3 volontaires recevaient le placebo. Les participantes étaient recrutées à l'Université d'Abomey-Calavi. Au total 54 participants ont reçu le vaccin PAMVAC avec un adjuvant et 3 ont reçu un placebo (**Figure 25**).

Chaque participant des deux sites a été suivi pendant 252 jours au cours desquels neuf visites ont été effectuées avec des collectes de données cliniques, biologiques et parasitologiques. A l'inclusion un screening comprenant des analyses biochimiques, hématologiques et sérologiques (VIH, Hépatite B et Hépatite C) ainsi qu'un test de grossesse (au Bénin) a été réalisé. Les femmes incluses dans l'essai étaient sous contraception durant toute la période de suivi. Les participants séropositifs VIH, VHB et VHC n'ont pas été inclus dans l'étude.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons réalisé au Bénin des prélèvements de 27 ml de sang veineux sur anticoagulant CPDA (citrates phosphate dextrose adénine) à cinq temps au cours du suivi afin de quantifier la réponse mémoire cellulaire induite par la vaccination avec PAMVAC. Les échantillons collectés étaient acheminés dans un délai de 4h à 20°C au laboratoire du CERPAGE. Nous avons procédé au fur à mesure à l'isolement des cellules mononucléées (CMN) et à leur conservation dans l'azote liquide (**Figure 25**).

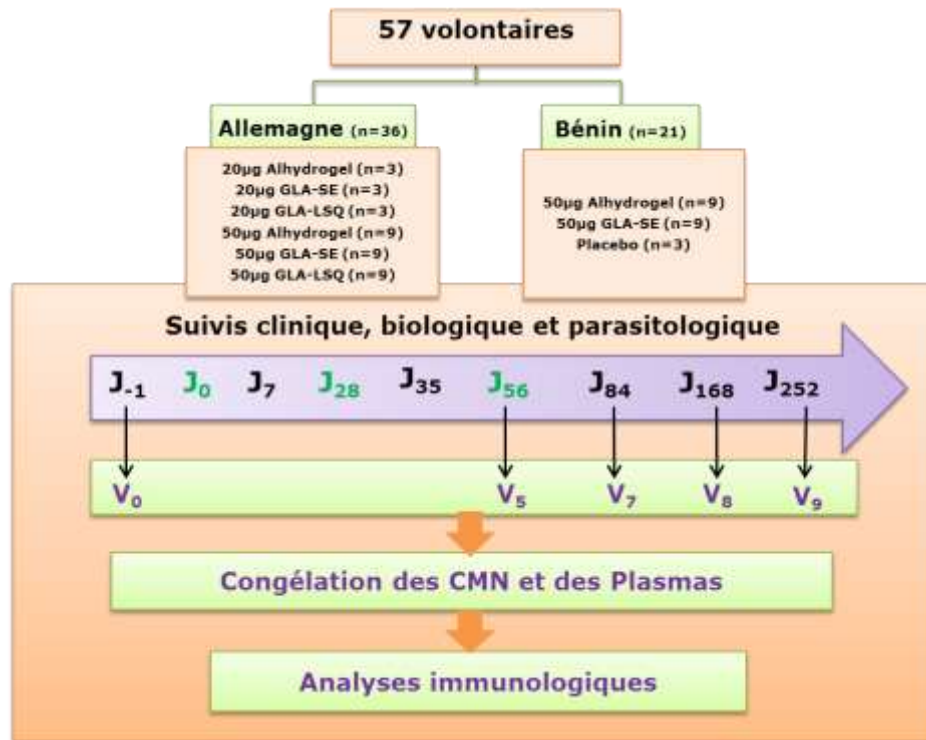


Figure 25 : Schéma représentatif du suivi des deux cohortes de l'étude PAMVAC.

2.3 Etude de la réponse mémoire via la stimulation des cellules mononuclées

2.3.1 Quantification des cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal

Les cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal (PAMVAC) et d'autres antigènes (CIDR, la toxine tétanique et un anti-IgG totales) ont été quantifiées par la technique ELISPOT. Le CIDR est un antigène non spécifique du PAG, dérivé d'un variant de la protéine *PfEMP1*. Cet antigène nous a permis de faire une comparaison avec l'antigène PAMVAC spécifique du PAG. Les CMN isolées des échantillons de sang des femmes volontaires nulligestes du Projet PAMVAC ont été décongelées et mises en culture pendant 6 jours en présence d'une cytokine, l'IL-15 et du CpGODN-2006 pour induire la différenciation de l'ensemble des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes). L'antigène vaccinal (PAMVAC), et les témoins (Anti-IgG, CIDR et Toxine tétanique) ont été adsorbés (coating) séparément dans les puits d'une plaque ELISPOT avec un fond en nitrocellulose. Les cellules différenciées ont été ensuite déposées dans chaque puits et ont été incubées une nuit à 37°C / 5% CO₂. Pendant l'incubation, les complexes antigène-anticorps formés entre les anticorps sécrétés par les cellules B spécifiques et les antigènes adsorbés sont immobilisés dans leurs puits respectifs. Après une étape de lavage, l'ajout d'un anticorps secondaire couplé à la

biotine et l'addition de la streptavidine ont permis la détection des complexes sous forme d'empreintes, ou de spot, au moyen d'une réaction enzymatique colorée. Le comptage des empreintes formées (anticorps-antigènes) correspondait à la quantification du nombre de cellules B mémoires sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène. L'analyse des plaques et le comptage des empreintes ont été réalisés avec le lecteur ELISPOT (CTL ImmunoSpot S6 Ultra-V, **Figure 26**).

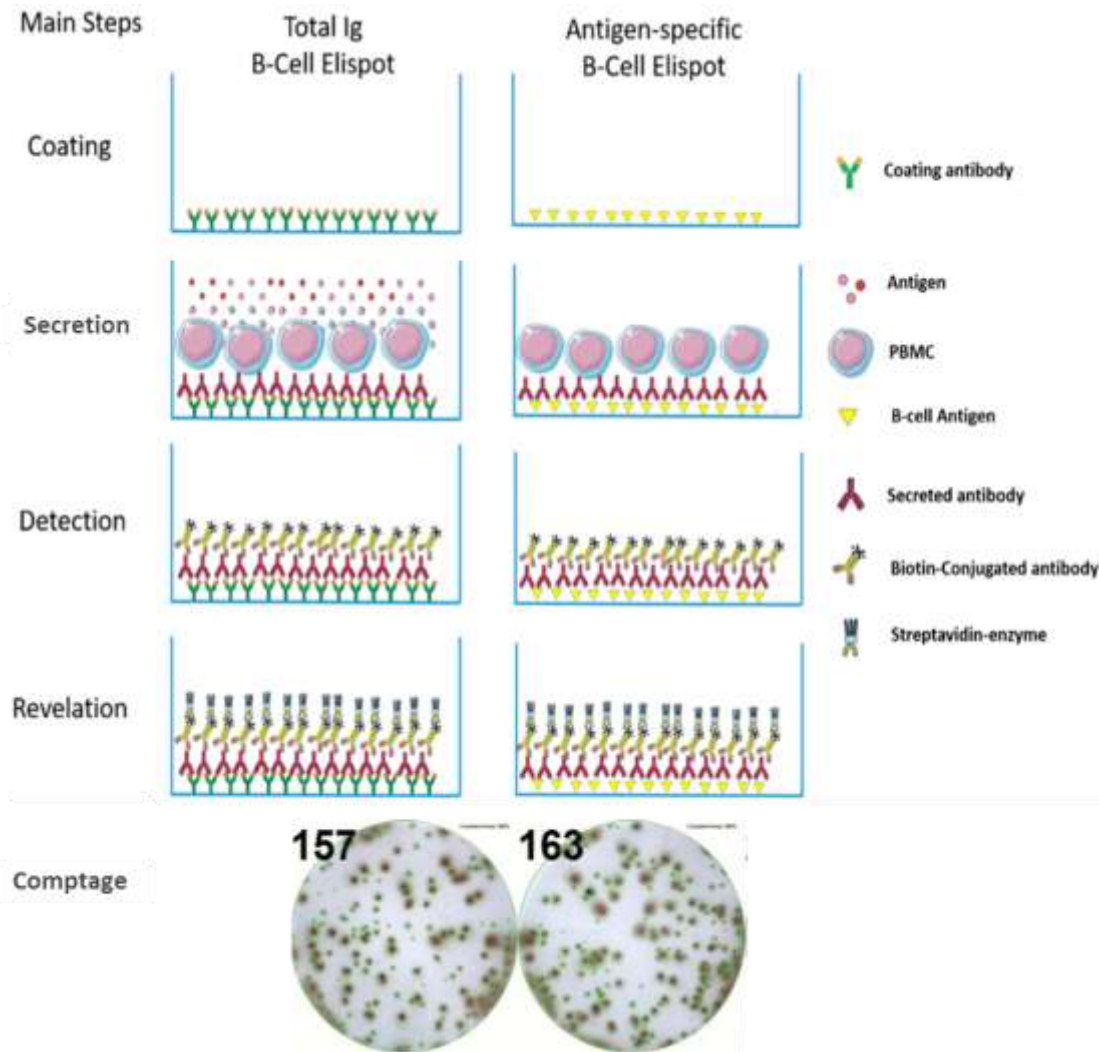


Figure 26 : Schéma représentatif des différentes étapes de la technique ELISPOT (335).

2.3.2 Détermination des profils de cytokine dans le surnageant de culture de CMN après la stimulation avec l'antigène vaccinal

Après décongélation, les CMN des volontaires nulligestes du projet PAMVAC ont été incubées à l'étuve (37°C, 5% CO₂) pendant une nuit avec du milieu culture complet (RPMI,

10% SVF, 1% L-glutamine à 200 mM, 1% Pénicilline et Streptomycine à 10000 UI) afin de restaurer l'intégrité des membranes cellulaires. Les cellules ont ensuite été récoltées, lavées et comptées. Ces CMN ont été réparties par puits (2.10^5 /puits) puis stimulées respectivement avec un antigène : la PHA ou l'antigène vaccinal (PAMVAC). Un puits de cellules non stimulées a servi de contrôle négatif. Les plaques ont été incubées pendant 72h à l'étuve puis centrifugées pendant 5 mn à 400g. Les surnageants de culture prélevés et conservés à -80°C ont été utilisés pour la détermination des cytokines sécrétées par les CMN après stimulation. Au moyen de la technique CBA, nous avons simultanément dosé six cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL13, IFN- γ et TNF- α) dans 50 μl de surnageant de culture à l'aide d'un cytomètre à flux (FACS CANTO II) selon les recommandations du fabricant. Les données obtenues ont été analysées par le logiciel FCAP version 3 pour déterminer les concentrations des cytokines mesurées en pg/ml. Les seuils de détection des cytokines mesurées étaient de 1,1 pg/ml, 1,6 pg/ml, 0,13 pg/ml, 0,6 pg/ml, 0,8 pg/ml et 1,2 pg/ml respectivement pour IL-5, IL-6, IL-10, IL13, IFN- γ et TNF- α (**Figure 23**).

2.3.3 Caractérisation des phénotypes de cellules mémoires

L'étude de la réponse mémoire via la caractérisation des cellules mémoires s'est réalisée sur deux projets. D'une part, nous avons utilisé les CMN de 21 nulligestes béninoises du projet PAMVAC pour caractériser le phénotype de la réponse mémoire cellulaire induite par le vaccin PAMVAC (**Figure 25**). D'autre part, les CMN de 17 femmes primigestes de l'étude à Sô-Ava ont servi au phénotypage des cellules mémoires induites en réponse à l'infection naturelle par *P. falciparum* (**Figure 24**).

Après décongélation et marquage pour déterminer la viabilité des CMN, l'immunophénotypage des cellules T et B a été réalisé par un marquage extracellulaire avec des anticorps monoclonaux. Les anticorps anti-CD4-FITC, anti-CD3-APC-eF780, anti-CD8-AF700, anti-CD45-PerCP-eF710, anti-CD27-SB436, anti-CD183-PE-Cy7, anti-CD185-SB600 et anti-CD279-APC ont été utilisés pour la caractérisation des sous-populations de LT (Thermofisher). Par ailleurs, les anticorps anti-CD19-eF450, anti-CD20-FITC, anti-CD21-APC, anti-CD10-SB600, anti-CD27-PE-Cy7, anti-CD38-PerCP-eF710 et anti-CD268-PE ont permis de déterminer les phénotypes des sous-populations de LB (Thermofisher). La combinaison des clusters de caractérisation a permis de définir les phénotypes cellulaires. Ainsi, parmi les cellules T, les LT naïfs (NTC) sont $\text{CD3}^+\text{CDR45RA}^+$, les LT mémoires (MTC) sont $\text{CD3}^+\text{CDR45RA}^-$, les LT mémoires centraux (TCM) sont $\text{CCR7}^+\text{CDR45RA}^-$

CD27⁺, les LT mémoires effecteurs (TEM) sont CCR7⁻CD45RA⁻CD27⁻, les LT mémoires effecteurs différenciés (TEMRA) sont CCR7⁻CD45RA⁺CD27⁻, LT mémoires folliculaires (Tfh) sont CXCR5⁺CD45RA⁻CD4⁺. Parmi les Tfh, l'expression du CXCR3 nous a permis de distinguer les Tfh 'Superior B cell helper' (PD1⁺CXCR3⁻) et les Tfh 'Inferior B cell helper' (PD1⁺CXCR3⁺). De même au sein de la population des cellules B, les LB immatures (iBC) sont CD19⁺CD10⁺, les LB matures (mBC) sont CD19⁺CD10⁻, les LB naïfs (NBC) sont CD19⁺CD10⁻CD27⁻CD21⁺, les LB activés (ABC) sont CD19⁺CD20⁺CD10⁻CD27⁺CD21⁻CD38⁻, les LB mémoires intermédiaires sont CD19⁺CD20⁺CD10⁻CD27⁺CD21⁻CD38⁺, les plasmocytes sont CD19⁺CD20⁻CD10⁻CD27⁺CD21⁻CD38^{high}, les LB mémoires classiques (cMBC) sont CD19⁺CD10⁻CD27⁺CD21⁺ et les LB mémoires atypiques (aMBC) sont CD19⁺CD10⁻CD27⁻CD21⁻. Les stratégies d'analyse des phénotypes des différentes populations lymphocytaires sont représentées sur la **Figure 27**.

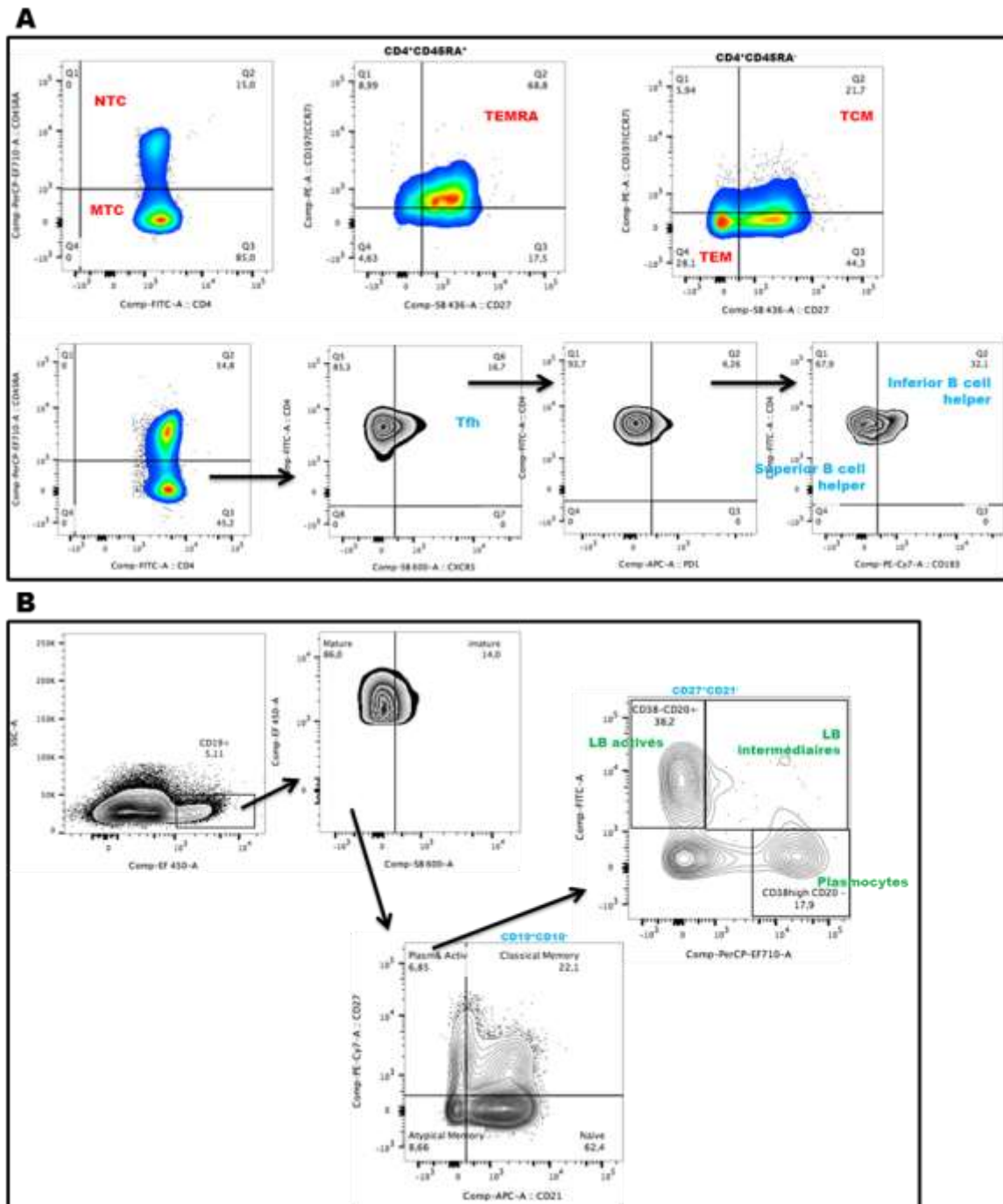


Figure 27 : Caractérisation des différentes populations de lymphocytes T (A) et de lymphocytes B (B)

CHAPITRE 3: Analyses statistiques

Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés avec les outils STATA 13 (StataCorp, College Station, TX USA), Prism 5.0 (Graph pad Inc, CA, USA) et Microsoft Excel 2010. Des tests paramétriques et non-paramétriques ont été utilisés en fonction des caractéristiques des données.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons comparé les concentrations de cytokines des différents groupes à celles d'un groupe témoin grâce au test non paramétrique de Kruskal-Wallis. La correction de Bonferroni a été appliquée pour corriger le nombre élevé de tests statistiques. Afin d'identifier des associations indépendantes entre les niveaux de cytokines et le PAG ou ses complications, nous avons effectué des analyses multivariées.

Dans la deuxième partie de nos travaux, les concentrations des cytokines ont été comparées pour chaque antigène en fonction des groupes de volontaires à l'aide de tests non paramétrique de Kruskal-Wallis en analyse univariée. Les réponses immunitaires ultérieures ont été comparées entre J0 et J56 ou J84 ou J168 à l'aide du test des rangs de Wilcoxon. Une correction de Bonferroni a été appliquée en raison des comparaisons multiples.

QUATRIEME PARTIE: RESULTATS

ARTICLE 1: Circulating cytokines associated with poor pregnancy outcomes in beninese exposed to infection with *Plasmodium falciparum*

Tatiana Hountohotegbe,^{a,b} Komi Gbedande,^{a,b} Gino Agbota,^{a,b} Samad Ibitokou,^{a,b} Achille Massougbodji,^{a,c,d} Philippe Deloron,^b Nadine Fievet,^b Adrian J. F. Luty^b

Journal : Infect Immun 2020 ; Volume 88 ; DOI : 10.1128/IAI.00042-20

Présentation au congrès :

- Avril 2018 : Multilatéral Initiative on Malaria (MIM), Dakar, Sénégal. Poster
- Juillet 2018 : First Malaria World Congress, Melbourne, Australie. Poster
- Novembre 2018: Infectious diseases in Africa, 8^{ème} Symposium, Cape Town

Au cours de la grossesse, il existe une susceptibilité aux infections du fait de la tolérance fœtale. Cette susceptibilité se traduit par une immunomodulation qui inhibe les réponses délétères au développement fœtal mais qui sont favorables aux infections. L'infection à *Plasmodium falciparum*, lorsqu'elle survient au cours de la grossesse, elle entraîne de graves conséquences pour la mère et le fœtus telles que l'anémie, le retard de croissance intra utérin, l'avortement, la prématurité et le faible poids à la naissance. Le paludisme placentaire entraîne une suppression des réponses cytokiniques nécessaires à l'élimination du parasite. L'identification de ces marqueurs dans le sang périphérique permettrait de prédire l'issue de la grossesse.

La présente étude faisant partie du Projet STOPPAM, a réalisé le suivi d'une cohorte de 400 femmes enceintes vivant en zone d'endémie palustre jusqu'à l'accouchement. Ces femmes sont réparties en 4 groupes comprenant les femmes infectées au cours de la grossesse, les femmes anémiées, celles ayant donné naissance à un bébé prématuré et celles ayant accouché un bébé avec un faible poids par rapport à l'âge gestationnel. L'objectif de l'étude est de déterminer les marqueurs immunologiques systémiques associés aux conséquences du paludisme gestationnel. Au cours du suivi longitudinal, des données cliniques et parasitologiques ont été collectées à l'inclusion, au cours de la grossesse et à l'accouchement. Les concentrations des cytokines IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70 et IFN- γ ont été mesurées dans le plasma des volontaires à l'aide de la cytométrie en flux.

D'une manière générale, nous avons observé de faibles concentrations en cytokines dans le plasma des volontaires à l'exception de l'IL-10. En effet, des taux d'IL-10 élevés ont été observés durant tout le suivi. Ces augmentations étaient significativement associées à la présence de l'infection palustre. De même, les faibles concentrations d'IFN- γ mesurées à

l'inclusion et à l'accouchement étaient également associées à la présence de l'infection palustre. De faibles concentrations en IL-5 mesurées à l'accouchement étaient associées à l'augmentation du risque de prématurité et de faible poids à la naissance des enfants.

Nos observations suggèrent d'une part, un effet immunosuppresseur de l'IL-10 sur la balance cytokinique chez les femmes infectées au cours de la grossesse. D'autre part, ils révèlent la présence de marqueurs immunologiques au niveau systémique associés à l'issue d'une grossesse en zone d'endémie palustre. Cette observation est conforme à l'hypothèse de l'utilisation à visée diagnostic ou pronostic des concentrations de cytokine au cours de la grossesse.



Circulating Cytokines Associated with Poor Pregnancy Outcomes in Beninese Exposed to Infection with *Plasmodium falciparum*

Tatiana Hountohotegbe,^{a,b} Komi Gbedande,^{a,b*} Gino Agbota,^{a,b} Samad Ibitokou,^{a,b*} Achille Massougbodji,^{a,c,d} Philippe Deloron,^b Nadine Fievet,^b Adrian J. F. Luty^b

^aCentre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Cotonou, Benin

^bUniversité de Paris, MERIT, IRD, Paris, France

^cFaculté des Sciences de la Santé de Cotonou (FSS), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin

^dInstitut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Calavi, Benin

ABSTRACT Malaria during pregnancy is a major cause of maternal morbidity as well as fetal and neonatal mortality. Previous studies, including our own, suggested that placental and peripheral cytokine and chemokine levels measured at delivery can be used as biomarkers for pregnancy outcomes. However, the timing of malaria infection during pregnancy matters, and these studies do not address the effect of different cytokines in peripheral blood plasma samples taken at early and midpregnancy and at delivery. Here, we aimed to investigate whether peripheral plasma cytokine levels were associated with pregnancy outcomes in a cohort of 400 Beninese pregnant women. Using a high-sensitivity cytometry-based method, we quantified the levels of interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-10, IL-12p70, and gamma interferon (IFN- γ) in peripheral plasma samples taken at two time points during pregnancy and at delivery in various groups of pregnant women identified with *Plasmodium falciparum* infection, with anemia, with preterm births, or giving birth to babies who are small for their gestational age. We found that, consistently at all time points, elevated levels of IL-10 were strongly and significantly associated with *P. falciparum* infection, while the levels of IFN- γ at inclusion and delivery were weakly but also significantly associated. Low levels of IL-5 at delivery were associated with a greater risk of both preterm births and small-for-gestational-age babies. The immunosuppressive effects of IL-10 likely affect the overall cytokine equilibrium during pregnancy in women harboring *P. falciparum* infections. Our findings highlight the peripheral signature of pregnancy outcomes and strengthen the idea of using cytokines as diagnostic or prognostic markers.

KEYWORDS cytokine, malaria, pregnancy outcomes

According to the World Health Organization, an estimated 228 million cases of malaria occurred worldwide, with 405,000 deaths, in 2018 (1). *Plasmodium falciparum* accounted for the majority of cases. In areas with high transmission of malaria, children under 5 years and pregnant women are particularly susceptible to infection, illness, and death (1). In sub-Saharan Africa, 11 million pregnant women exposed to malaria infections in 2018 would have delivered about 872,000 children with low birth weight (1). The increased susceptibility of pregnant women to malaria compared to nonpregnant adults is due, in part, to the physiological adaptation of the maternal immune system to prevent rejection of the fetus as a semiallogeneic transplant (2). In this context, an important role is played by cytokines, the levels of which change during the different trimesters of pregnancy.

Citation Hountohotegbe T, Gbedande K, Agbota G, Ibitokou S, Massougbodji A, Deloron P, Fievet N, Luty AJF. 2020. Circulating cytokines associated with poor pregnancy outcomes in Beninese exposed to infection with *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 88:e00042-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00042-20>.

Editor DeBroski R. Herbert, University of Pennsylvania

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Adrian J. F. Luty, adrian.luty@ird.fr.

* Present address: Komi Gbedande, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA; Samad Ibitokou, Poseida Therapeutics, San Diego, California, USA.

Received 21 January 2020

Returned for modification 2 March 2020

Accepted 29 May 2020

Accepted manuscript posted online 8 June 2020

Published 21 July 2020

During the first trimester, proinflammatory cytokines act as mediators of the embryo-maternal paracrine dialogue associated with apposition, attachment, and invasion (3, 4). In this process, members of the interleukin-6 (IL-6) cytokine superfamily are required at the early implantation stage. While leukemia inhibitory factor (LIF) is expressed at the highest concentrations in the endometrial glands and is strongly associated with normal implantation, IL-11 acts on endometrium luminal epithelium to facilitate blastocyst attachment and implantation (5, 6). The IL-12/IL-15/IL-18 system cooperates with the IL-1 system and other cytokines, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor (EGF), via interactions with endometrial leukocytes and natural killer cells in local angiogenesis and tissue remodeling (7). Cellular immune responses also play an important role with human decidual natural killer cells that promote trophoblast invasion through the production of IL-8, interferon (IFN)-inducible protein 10 (IP-10), VEGF, and placental growth factor (8).

Once implantation has taken place, successful pregnancy is characterized by a cytokine balance that is tipped toward a predominantly T helper 2 (Th2)-type response. Progesterone contributes to support IL-3, IL-4, IL-5, and IL-10 production, which inhibits Th1 responses and favors allograft tolerance in women (9). In addition, in the systemic circulation of healthy pregnant women, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-13 production progressively increases, while the serum levels of most Th1-type cytokines decrease significantly after the second trimester compared with the levels observed during the first trimester (10).

Given the importance of the timely regulation of cytokine networks during pregnancy, the dysregulation of this system at both local and systemic levels is invariably characteristic of adverse pregnancy outcomes, including spontaneous abortion, pre-term labor, pre-eclampsia, and intrauterine growth restriction (IUGR) (11, 12). Thus, Th1-type response alterations at implantation sites have been associated with placental tissue damage in some inflammatory diseases. Such is the case when *P. falciparum* infection occurs during pregnancy, leading to a pronounced proinflammatory response in the placenta with deleterious effects on both maternal and fetal health (13, 14).

So-called placental malaria (PM) is characterized by the sequestration of parasite-infected erythrocytes in the maternal intervillous blood spaces of the placenta. The parasite-derived protein VAR2CSA, which is transported to and expressed on the surface of infected erythrocytes, mediates this sequestration (15). VAR2CSA binds to chondroitin sulfate A (CSA) on the proteoglycan syndecan-1, which is expressed by syncytiotrophoblasts (16). The infected erythrocytes that cause PM elicit Th1-type cytokine production in the placenta, where elevated levels of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-2, IFN- γ , and IL-1 β , are observed, especially in primigravidae (17). Increased placental levels of chemokines have also been described, leading to monocyte infiltration along with the recruitment of macrophages, cytotoxic T cells, B cells, and granulocytes into the placenta (18, 19). T cell proliferation and enhanced macrophage phagocytic activities, aimed at controlling parasite proliferation, are a feature of the inflammatory response during PM (17, 20).

The persistence of infected erythrocytes, accompanied by the excessive accumulation of leukocytes in the intervillous spaces of the placenta, are ultimately responsible for the pathological outcomes of PM. In this context, numerous studies have investigated the relationships between cytokine production during PM and pregnancy outcomes (21–25). High levels of placental TNF- α were associated with several pregnancy outcomes, including severe anemia, low birth weight (LBW), and IUGR (21). Likewise, high expression of IL-8 associated with IUGR was found in placentas of multigravidae (21, 22). Furthermore, in a previous study, our findings revealed an association between babies with low birth weight for their gestational age (GA) and low placental plasma levels of IFN- γ and IL-5, independent of gravidity (25).

However, in peripheral blood, parasite-specific immune responses may be decreased due to the trafficking of cells out of the circulation and the reduction of peripheral parasitemia as the development of the placenta is completed (26–28). Low levels of cytokines were detected in systemic plasma of pregnant women at delivery,

TABLE 1 Description of the study population

Characteristic	Value
Women	
Mean age (yr)	26.5 (25.9–27.1) ^a
Mean gestational age at inclusion ^b in days (range)	114 (38–189)
Mean gestational age at ANV4 ^b in days (range)	241 (164–285)
Mean no. of ANV (range)	4 (1–7)
Mean no. of IPT ^c (range)	1.94 (0–3)
No. (%) with:	
Primigravidity	64 (16)
Use of bed nets	88 (22)
Absence of education	244 (61)
Malaria^d (no. with <i>P. falciparum</i> infection/total no. tested)	
At inclusion	70/397 (18)
During follow-up	
0	227/397 (57)
1	112/397 (28)
≥2	58/397 (15)
Delivery	59/388 (15)
Anemia^e (no. with anemia/total no. tested)	
At inclusion	120/393 (31)
During follow-up	
0	105/369 (28)
1–3	47/369 (13)
≥4	217/369 (59)
Delivery	168/373 (45)
Children	
Gestational age at birth, mean days (range)	277 (227–300)
No. of preterm births ^f /total no. tested (%)	20/359 (6)
Birth weight	
Mean (g)	2,979 (2,934–3,023) ^g
No. with SGA ^g /total no. tested (%)	64/391 (16)

^aRepresents 95% confidence intervals.^bUltrasound examination was performed before the 24th week of gestation.^cIntermittent preventive treatment.^dOn the basis of thick blood smear microscopy.^eHemoglobin concentration, <10 g/dl.^fBabies born before 37 weeks of gestation.^gAccording to the charts of Schmiegelow et al. (51).

and these were not significantly related to pregnancy outcomes (23, 24, 29). Immune responses in the context of malaria during pregnancy are generally underexplored, and longitudinal studies could lead to a better understanding of the relationship between peripheral immune markers and poor pregnancy outcomes.

Here, the relationships between *P. falciparum* infections and peripheral plasma cytokine activity during pregnancy, on one hand, and the consequences of different immune equilibria on pregnancy outcomes, on the other hand, were investigated. Therefore, circulating plasma levels of IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, and IFN- γ were measured at different gestational ages in a cohort of Beninese women to identify biomarkers potentially of prognostic and/or diagnostic value for pregnancy-associated malaria (PAM) and/or for poor pregnancy outcomes.

RESULTS

Description of the study population. From the 1,037 women included in the whole STOPPAM (Strategies to Prevent Pregnancy-Associated Malaria) cohort, 400 were selected according to their clinical and parasitological status for the current study. The characteristics of the women and their newborns are presented in Table 1. The women's mean age was 26.5 years (95% confidence interval [CI], 25.9 to 27.1), 64 (16%) were primigravid, and the mean gestational age (GA) assessed by ultrasound at inclusion was 114 days (16.3 weeks). For comparison, the mean age of the whole cohort was 26.4 years, 18.2% were primigravidae, and the mean GA at inclusion was 17.2 weeks (30). At inclusion in this subgroup of 400, 70 (18%) women were infected

with *P. falciparum* and 120 (31%) were anemic. During the follow-up, the mean GA at antenatal visit 4 (ANV4) was 34.4 weeks, slightly more than half (57%) remained free of *P. falciparum* infection, while 112 (28%) were infected once and 58 (15%) were infected twice or more. Anemia was detected in 105 (28%) throughout follow-up, while 217 (59%) were found to be anemic on more than four occasions. At delivery, 59 (15%) mothers were infected with *P. falciparum* and 168 (45%) were anemic. Mean GA at delivery was 277 days (39.6 weeks; 95% CI, 276 to 278), while 20 (6%) babies were preterm births (PTB) and 64 (16%) were small for their gestational age (SGA).

Pattern of peripheral plasma cytokine concentrations during pregnancy. We assessed the levels of IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, and IFN- γ at inclusion, at ANV4, and at delivery. Figure 1 and Table 2 show the overall patterns observed in univariate analyses without segregation of women into different groups. The concentration of IL-10 decreased at ANV4 and increased at delivery ($P = 0.015$), while the levels of the other cytokines showed a marked tendency to decline during pregnancy, significantly so in the case of both IL-5 and IL-12p70 ($P < 0.001$ and $P = 0.043$).

Table 3 shows the results of univariate comparison of cytokine levels during pregnancy between the healthy control group and those with infection, with anemia, or with poor pregnancy outcomes. IL-10 was higher in all groups (PAM, anemia, PTB, and SGA) at all times (inclusion [INC], ANV4, and delivery [DEL]) compared to the control group.

Table 4 shows the cytokine distribution as a function of the number of *P. falciparum* infections detected during pregnancy (none, one, and two or more, but excluding those detected at delivery). The levels of IL-10 were significantly higher in the infected versus uninfected groups, regardless of the number of infections or the time point ($P < 0.001$ in all cases) but with a tendency for levels to decrease over the course of pregnancy among women with two or more infections. The median levels of the other cytokines did not differ among the different groups at the different time points.

Association between cytokine levels, *P. falciparum* infection, and pregnancy outcomes using multivariate analysis. (i) Association between *P. falciparum* infections and cytokine levels at each time point. Table 5 shows the results of multivariate analyses performed to determine the influence of *P. falciparum* infection at each time point on cytokine concentrations at the same time after adjustment for anemia, PTB, and SGA at each time point during pregnancy. Among *P. falciparum*-infected mothers, IFN- γ concentrations at inclusion ($P = 0.032$; average variation of cytokine concentrations associated with the presence of *P. falciparum* infection [coef], 0.43) and at delivery ($P = 0.004$, coef = 0.67) were slightly but significantly increased, whereas IL-10 levels were strongly and significantly increased at all three time points (INC, $P < 0.001$, coef = 11.19; ANV4, $P < 0.001$, coef = 29.01; DEL, $P < 0.001$ coef = 45.95). Of note, IL-10 levels were lower in multigravid than primigravid women at inclusion ($P = 0.004$, coef = -4.43) and ANV4 ($P = 0.006$, coef = -11.33).

(ii) Association between *P. falciparum* infections during pregnancy and cytokine levels at delivery. After adjusting for anemia, PTB, SGA, and *P. falciparum* infection at delivery, the association between the occurrence of PAM and cytokine levels at delivery was evaluated (Table 5). *P. falciparum* infection was associated only with IL-10 concentrations: women who had had at least one *P. falciparum* infection during pregnancy had a significantly higher level of IL-10 at delivery than those with no infection during pregnancy ($P = 0.036$, coef = 24.01). Also of note, the level of IL-10 was significantly lower as a function of increased numbers of *P. falciparum* infections during pregnancy ($P = 0.017$, coef = -13.83).

(iii) Association between cytokine concentrations at inclusion and *P. falciparum* infection status during pregnancy. The association between cytokine levels at inclusion and the occurrence of *P. falciparum* infection during pregnancy was analyzed (Table 6), controlling for PTB, SGA, and anemia and adjusting for cytokine levels on *P. falciparum* infection at inclusion. Elevated IFN- γ concentrations at inclusion were associated with a significantly reduced risk of *P. falciparum* infection during pregnancy ($P = 0.035$, odds ratio [OR] = 0.82), while for increased IL-12p70 levels the risk of

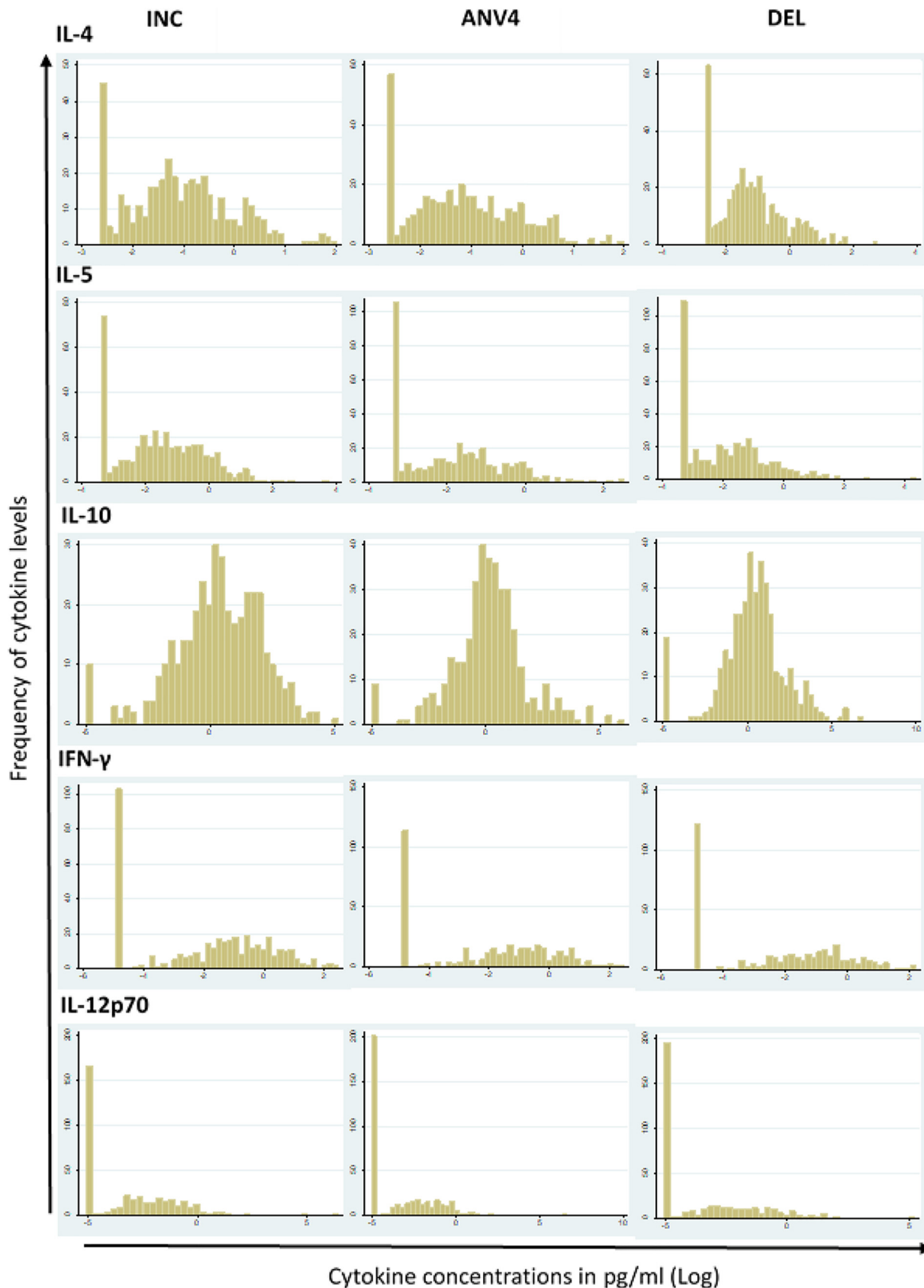


FIG 1 Overall distribution of cytokine according to peripheral plasma levels detected at inclusion, ANV4, and at delivery. The frequency of log-transformed levels of cytokine is represented.

TABLE 2 Cytokine concentrations during pregnancy^a

Cytokine and time of assay during pregnancy	No. of peripheral plasma samples	Concn (pg/ml)			Threshold detection level (pg/ml)
		Median	<i>P</i> value	Range	
IL-4			0.075		0.072
INC	390	0.325		0.072–7.549	
ANV4	388	0.305		0.072–7.299	
DEL	387	0.274		0.072–15.950	
IL-5			<0.001		0.034
INC	390	0.212		0.034–41.444	
ANV4	388	0.152		0.034–12.727	
DEL	387	0.134		0.034–78.234	
IL-10			0.015		0.007
INC	390	1.473		0.007–177.155	
ANV4	388	1.171		0.007–435.557	
DEL	387	1.504		0.007–954.225	
IFN- γ			0.139		0.007
INC	390	0.233		0.007–11.740	
ANV4	388	0.197		0.007–12.218	
DEL	387	0.164		0.007–9.238	
IL-12p70			0.043		0.006
INC	390	0.039		0.006–621.541	
ANV4	388	0.006		0.006–756.269	
DEL	387	0.006		0.006–187.289	

^aCytokine median (range) concentrations during pregnancy at inclusion (INC), ANV4, and at delivery (DEL) were compared with Kruskal-Wallis test. *P* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

infection with *P. falciparum* was increased ($P < 0.001$, OR = 2.65). Maternal age was independently associated with a decreased risk of infection (20 to 30 years, $P = 0.010$, OR = 0.47; >30 years, $P = 0.001$, OR = 0.31), while an increased number of ANV ($P = 0.003$, OR = 1.46) was also independently associated with a significantly increased risk of *P. falciparum* infection during pregnancy.

With respect to the number of episodes of *P. falciparum* infection during pregnancy, there was a positive association with IL-12p70 levels at inclusion ($P = 0.020$; incidence ratio [IR], 1.01). Of particular note, we did not find any relationship between IL-10 concentrations at inclusion and either the presence or the number of episodes of *P. falciparum* infection during pregnancy.

The same multivariate analysis, performed to analyze the association between anemia and cytokine concentrations, did not reveal any effect of one on the other (data not shown).

(iv) Cytokine levels predict pregnancy outcomes. The relationships between cytokine concentrations during pregnancy and PTB or SGA babies were analyzed after adjustment for *P. falciparum* infection and anemia (Table 7).

In the context of PTB, increasing concentrations of IL-12p70 at inclusion and of both IL-5 and IL-10 at ANV4 were associated with a higher risk of PTB ($P = 0.005$, OR = 9.42; $P = 0.004$, OR = 7.43; and $P = 0.001$, OR = 1.02, respectively). In contrast, increasing concentrations of IL-12p70 ($P = 0.010$, OR = 0.16) and IL-4 ($P = 0.009$, OR = 0.10) at ANV4 and, separately, of IL-5 at delivery ($P = 0.038$, OR = 0.11) were associated with a lower risk of PTB.

In the context of SGA, increasing IL-5 levels at inclusion displayed an association of borderline significance with a higher risk of SGA ($P = 0.054$, OR = 1.41), while at delivery the association was significant but reversed ($P = 0.049$, OR = 0.42).

Independently of the associations with cytokines, multigravid women had a significantly lower risk of SGA ($P = 0.022$, OR = 0.42), while women with more than three episodes of anemia had a significantly higher risk ($P = 0.041$, OR = 2.47).

TABLE 3 Cytokine concentrations in the groups of women^a

Cytokine and time during pregnancy	Control (n = 60)		PAM (n = 170)		Anemia (n = 264)		PTB (n = 20)		SGA (n = 64)		P value
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
IL-4											
INC	0.356	0.192-0.703	0.296	0.138-0.634	0.333	0.149-0.682	0.282	0.233-0.507	0.297	0.152-0.702	0.399
ANV4	0.333	0.188-0.785	0.265	0.126-0.723	0.309	0.132-0.699	0.236	0.091-0.370	0.266	0.139-0.641	0.310
DEL	0.310	0.169-0.737	0.256	0.144-0.456	0.256	0.134-0.567	0.264	0.155-0.346	0.237	0.120-0.432	0.173
IL-5											
INC	0.260	0.066-0.562	0.244	0.082-0.722	0.202	0.082-0.596	0.276	0.150-0.744	0.181	0.051-0.722	0.815
ANV4	0.175	0.034-0.336	0.150	0.036-0.388	0.161	0.044-0.356	0.190	0.048-0.283	0.139	0.037-0.316	0.834
DEL	0.137	0.058-0.408	0.147	0.034-0.325	0.137	0.034-0.347	0.179	0.034-0.324	0.118	0.034-0.318	0.169
IL-10											
INC	0.746	0.245-1.554	2.837	0.788-8.342	1.809	0.692-6.428	3.905	0.917-6.572	2.679	0.594-6.288	<0.001
ANV4	0.728	0.199-1.336	1.907	0.924-3.659	1.335	0.641-2.822	1.960	0.509-5.875	1.275	0.692-3.357	<0.001
DEL	0.865	0.320-1.858	2.137	0.966-5.748	1.526	0.608-3.821	3.402	1.641-5.159	2.089	0.951-7.262	<0.001
IFN- γ											
INC	0.280	0.007-0.869	0.246	0.007-0.787	0.221	0.007-0.821	0.286	0.025-0.851	0.255	0.023-0.869	0.830
ANV4	0.280	0.023-0.854	0.162	0.007-0.673	0.229	0.007-0.722	0.129	0.007-0.530	0.290	0.020-0.677	0.596
DEL	0.157	0.062-0.587	0.164	0.007-0.587	0.185	0.007-0.669	0.150	0.007-0.393	0.185	0.007-0.565	0.511
IL-12p70											
INC	0.056	0.006-0.224	0.028	0.006-0.181	0.036	0.006-0.219	0.027	0.006-0.185	0.037	0.006-0.197	0.527
ANV4	0.034	0.006-0.133	0.006	0.007-0.147	0.007	0.006-0.166	0.007	0.006-0.108	0.014	0.006-0.206	0.803
DEL	0.030	0.006-0.180	0.007	0.006-0.125	0.010	0.006-0.160	0.007	0.006-0.054	0.007	0.006-0.100	0.386

^aThe concentrations of each cytokine are represented by clinical groups (PAM, mothers who experienced *P. falciparum* infection during pregnancy; anemia, mothers who had anemia during pregnancy; PTB, women with preterm birth babies; SGA, women who delivered babies with low birth weight for gestational age). Each group was compared to a control group of mothers with no infection, no anemia, and with term-delivered babies and adequate birth weight for gestational age, using the Kruskal-Wallis test. IQR, interquartile range.

^bP values of ≤ 0.0008 were considered statistically significant following application of Bonferroni correction.

TABLE 4 Cytokine levels as a function of the number of *P. falciparum* infections during pregnancy^a

Cytokine and time	Cytokine level by no. of infections						P value
	None (n = 227)		One (n = 112)		Two or more (n = 58)		
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
IL-4							
INC	0.359	0.192–0.664	0.304	0.169–0.634	0.291	0.114–0.622	0.370
ANV4	0.320	0.170–0.674	0.268	0.132–0.682	0.262	0.078–0.781	0.282
DEL	0.284	0.151–0.648	0.274	0.155–0.464	0.234	0.091–0.450	0.354
IL-5							
INC	0.194	0.059–0.512	0.257	0.001–0.766	0.211	0.082–0.652	0.098
ANV4	0.154	0.034–0.338	0.153	0.044–0.399	0.141	0.034–0.380	0.946
DEL	0.124	0.034–0.363	0.153	0.034–0.319	0.148	0.034–0.392	0.890
IL-10							
INC	1.192	0.352–3.029	2.597	0.725–7.528	3.468	0.945–10.328	<0.001
ANV4	0.813	0.365–1.626	1.716	0.751–3.489	2.555	1.098–9.065	<0.001
DEL	1.213	0.442–2.773	2.210	0.977–5.748	1.708	0.956–4.224	<0.001
IFN-γ							
INC	0.229	0.007–0.827	0.246	0.007–0.721	0.251	0.007–0.883	0.971
ANV4	0.229	0.007–0.714	0.153	0.007–0.734	0.173	0.007–0.590	0.377
DEL	0.154	0.007–0.683	0.196	0.007–0.659	0.048	0.007–0.328	0.058
IL-12p70							
INC	0.043	0.006–0.215	0.041	0.006–0.153	0.021	0.006–0.229	0.730
ANV4	0.025	0.006–0.133	0.006	0.006–0.149	0.006	0.006–0.146	0.317
DEL	0.015	0.006–0.162	0.010	0.006–0.134	0.006	0.006–0.092	0.370

^aComparison of cytokine levels by number of *P. falciparum* infections during pregnancy, with the exclusion of infections observed at delivery. P values are from comparisons between mothers who had no PAM, mothers who had only one infection during pregnancy, and mothers who had at least 2 episodes of PAM using the Kruskal-Wallis test. P values of ≤0.003 were regarded as statistically significant following application of Bonferroni correction.

DISCUSSION

The primary aim of the study described here was to determine whether the levels of circulating cytokines, measured at different moments during a longitudinal study of pregnancy-associated malaria in a cohort of Beninese, reliably reflected the different pregnancy outcomes recorded. Our basis for the study was an observation made in our

TABLE 5 Multivariate analysis of impact of *P. falciparum* infection on cytokine levels during pregnancy^a

Cytokine and time	Variable and associated covariable	Occurrence of <i>P. falciparum</i> infection	No. of samples	Coef ^b	95% CI ^c	P value
Each time point						
IFN-γ						
INC	<i>P. falciparum</i> infection		70	0.43	0.38, 0.82	0.032
ANV4	<i>P. falciparum</i> infection		28	-0.06	-0.58, 0.45	0.805
DEL	<i>P. falciparum</i> infection		59	0.67	0.21, 1.12	0.004
IL-10						
INC	<i>P. falciparum</i> infection		70	11.19	8.19, 14.20	<0.001
	Gravidity (≥2)		333	-4.43	-7.46, -1.40	0.004
ANV4	<i>P. falciparum</i> infection		28	29.01	17.47, 40.56	<0.001
	Gravidity (≥2)		333	-11.33	-19.34, -3.32	0.006
DEL	<i>P. falciparum</i> infection		59	45.95	26.82, 65.08	<0.001
	Gravidity (≥2)		333	-4.15	-21.51, 13.20	0.638
Delivery						
IL-10		At least one episode of <i>P. falciparum</i> infection	397	24.01	1.52, 46.51	0.036
		No. of episodes of <i>P. falciparum</i> infection	397	-13.83	-25.20, -2.46	0.017

^aAt each time point, the independent effect of *P. falciparum* infection on cytokine levels was detected after adjusting for anemia, PTB, and SGA. A total of 187 women had at least 1 infection during pregnancy. Multivariate analysis was performed using all the factors that remained from the univariate analysis. Cytokine concentrations at delivery were adjusted on *P. falciparum* infection at delivery before testing their association with occurrence of *P. falciparum* infection during pregnancy. Only data from the multivariate regression model are shown. P values of ≤0.05 were regarded as statistically significant.

^bCoef represents the average variation of cytokine concentrations associated with the presence of *P. falciparum* infection, number of *P. falciparum* infections, and other covariables. Gravidity was used as a categorical variable. Other factors included in the models as covariates are maternal age, gestational age, education level, IPT, ANV, birth weight, and use of bed nets.

^cRepresents 95% confidence intervals.

TABLE 6 Effect of cytokine levels at inclusion on *P. falciparum* infection during pregnancy^a

Cytokine at inclusion and covariable associated	No. of samples	IR ^b	OR ^c	95% CI ^d	P value
Presence of infection					
IL-12p70	390		2.65	1.90, 3.69	<0.001
ANV no.	397		1.46	1.13, 1.88	0.003
IFN- γ	390		0.82	0.69, 0.99	0.035
ANV no.	397		1.32	1.04, 1.67	0.022
Maternal age					
20–30 yr	214		0.47	0.27, 0.84	0.010
>30 yr	90		0.31	0.16, 0.60	0.001
No. of infections					
IL-12p70	390	1.01		1.00, 1.02	0.020
ANV no.	397	1.17		1.03, 1.33	0.016
Birth wt	397	1.00		0.99, 1.01	0.018

^aAfter adjusting for anemia, PTB, and SGA, cytokine levels were also adjusted on *P. falciparum* infection at inclusion to detect their independent effect on *P. falciparum* infection occurring during pregnancy.

^bIR, incidence rate ratio. OR and IR represent the risk of *P. falciparum* infection and the risk of increasing incidence of *P. falciparum* infection during pregnancy, respectively. Maternal age was used as a categorical variable. Other factors included in the models as covariates are gravidity, gestational age, education, IPT, ANV, birth weight, and use of bed nets.

^cOR, odds ratio.

^dRepresents 95% confidence intervals. Multivariate analysis was performed using all the factors that remained from the univariate analysis. Only data from the multivariate regression model with a *P* value of ≤ 0.05 are shown and regarded as statistically significant.

own earlier study of cytokines in placental plasma at delivery. In that study, we found that low levels of both IFN- γ and IL-5 were associated with the delivery of SGA babies and, thus, could represent markers of such a poor pregnancy outcome (25). Other studies, including our own, have also consistently shown that high levels of IL-10 present in placental plasma are closely associated with the occurrence of infections with *P. falciparum* during pregnancy.

Here, multivariate analyses were performed to determine (i) whether circulating cytokine concentrations at different time points of pregnancy were associated with either *P. falciparum* infections or poor pregnancy outcomes; (ii) the predictive value of circulating cytokine levels at inclusion with respect to *P. falciparum* infection and poor pregnancy outcomes; and (iii) the associations between episodes of *P. falciparum* infection and of anemia during pregnancy and the levels of cytokines at delivery.

Considering IL-10, multivariate analyses showed that high concentrations are strongly associated at each time point during pregnancy with *P. falciparum* infections. In addition, increased IL-10 levels observed at delivery were associated with *P. falciparum* infections that had occurred during pregnancy. Thus, these observations are consistent with the results of our own previous studies as well as those of others (25, 31–33). IL-10 is a key immunoregulatory molecule during infection. That IL-10 exerts direct effects on CD4⁺ T cells, inhibiting proliferation and the production of IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, and TNF- α , is well documented (34–36). Thus, IL-10 can suppress both Th1- and Th2-type responses. That capacity is consistent with our observations here of declining concentrations of both Th1- and Th2-type cytokines, significant in the case of both IL-5 and IL-12p70, in the face of sustained infection-induced IL-10 levels throughout pregnancy. Placental infection with *P. falciparum* is characterized by parasite-infected erythrocyte sequestration associated with often pronounced inflammation leading to detectable proinflammatory markers in peripheral blood (37). Thus, as a direct reflection of infection in the placenta, the inflammatory response and ensuing pathology can lead to poor pregnancy outcomes. We speculate that the strong IL-10 response observed in association with infection is a driving force in suppressing both potentially protective as well as pathological immune responses to maintain a healthy

TABLE 7 Multivariate analysis of cytokine levels and pregnancy outcomes^c

Pregnancy outcome, cytokine or covariable, and time of cytokine assays	No. of samples	OR ^a	CI 95% ^b	P value
PTB				
IL-12p70				
INC	390	9.42	1.99, 44.47	0.005
ANV4	388	0.16	0.04, 0.64	0.010
DEL	387	0.16	0.00, 14.09	0.419
IL-4				
INC	390	1.19	0.16, 8.65	0.860
ANV4	388	0.10	0.02, 0.57	0.009
DEL	387	0.50	0.02, 14.02	0.687
IL-10				
INC	390	0.99	0.91, 1.07	0.789
ANV4	388	1.02	1.01, 1.03	0.001
DEL	387	0.99	0.98, 1.01	0.733
IL-5				
INC	390	0.46	0.11, 1.81	0.268
ANV4	388	7.44	1.91, 28.97	0.004
DEL	387	0.12	0.01, 0.89	0.038
SGA				
IL-5				
INC	390	1.41	0.99, 2.00	0.054
ANV4	388	0.59	0.13, 2.78	0.510
DEL	387	0.42	0.18, 0.99	0.049
Gravidity (≥ 2)	333	0.42	0.20, 0.88	0.022
No. of episodes of anemia	369			
≥ 1 and ≤ 3	47	1.53	0.39, 4.17	0.506
> 3	217	2.47	1.03, 5.92	0.041

^aOR, odds ratio. OR represents the risk of occurrence of PTB or SGA.

^bRepresents 95% confidence intervals.

^cCytokine concentrations were adjusted for the presence of anemia and *P. falciparum* infection to detect the independent association between cytokine levels and PTB on one hand and SGA on the other hand. All factors, along with gravidity, were included in univariate analysis. Factors with *P* values of < 0.2 were included in multivariate analysis. Gravidity and number of episodes of anemia are used as categorical variables. Other factors included in the models as covariates are maternal age, gestational age, education, IPT, ANV, birth weight, and use of bed nets. Only cytokines remaining associated in the multivariate regression model are shown. *P* values of ≤ 0.05 were regarded as statistically significant.

pregnancy. Thus, parasite persistence in the placenta is an unintended consequence of maternal efforts to control inflammatory responses. Separately, we did notice lower levels of IL-10 at ANV4 compared with the levels found either at inclusion or at delivery, an observation that was consistent across all groups, regardless of their infection or other status (Tables 2 and 3). We speculate that this particular finding is related to women's changing overall immunological status during pregnancy that is thought to progress from an initial predominantly proinflammatory state to a more Th2-dominated noninflammatory environment before reverting to a proinflammatory state late in pregnancy prior to parturition (4). Thus, the comparatively lower levels of IL-10 seen at ANV4 would correspond to the noninflammatory period during which, logically, the necessity for IL-10 is reduced. Perhaps somewhat paradoxically, the circulating concentration of IL-10 at delivery also was found to be significantly lower in women who experienced multiple infections during pregnancy (Table 5, lower rows). This finding could reflect the fact that, upon detection, infections were always immediately treated, as stipulated in the study protocol. Therefore, in the case of those with multiple infections, it is plausible that proinflammatory responses, and the associated anti-inflammatory IL-10-led responses, will have had insufficient time to be well-established and, hence, to persist in the case of repeated treatments. This would be entirely consistent with our published findings concerning the association between submicroscopic infections and circulating cytokine levels (33).

We also observed increased IL-10 levels associated with *P. falciparum* infection in primigravid compared with multigravid women. In high-transmission areas, primigravidae are at greater risk of placental infection, whereas such a gravidity effect is less marked in low-transmission areas and absent from areas with epidemic malaria (38, 39). Gravidity-specific immunity, naturally acquired through consecutive pregnancies, contributes to resistance to placental infection with *P. falciparum*, reduces parasite densities, and prevents disease in areas of high and stable transmission. Thus, among primigravidae who lack specific acquired immunity, severe anemia and the delivery of underweight babies are more frequent. In addition, although the risk of maternal infection is reported to be highest during the second trimester (40), data from our own earlier studies suggest that *P. falciparum* infections can be particularly harmful at the beginning and at the end of pregnancy (30). This is consistent with our current observation concerning the association of *P. falciparum* infection with higher circulating levels of IL-10 in primigravid compared with multigravid women. Multivariate analysis of the predictive value of the cytokines assessed here did not reveal elevated IL-10 at inclusion to be associated with the risk of *P. falciparum* infection during pregnancy. In the STOPPAM study conducted in Tanzania, the combination of increased IL-10 and IP10 with decreased RANTES was predictive of infection with *P. falciparum* regardless of gestational age (31). Overall, the data suggest that IL-10 can be useful as a diagnostic rather than a prognostic marker of *P. falciparum* infection during pregnancy.

In the context of IL-12p70, increased levels of this proinflammatory cytokine at inclusion were associated with a significantly increased prospective risk both of *P. falciparum* infection during pregnancy as well as of preterm birth. On the other hand, increased levels at the inclusion of IFN- γ , a Th1-type proinflammatory cytokine, were associated with a significantly decreased prospective risk of *P. falciparum* infection during pregnancy, whereas when infections were present (at inclusion and at delivery), the levels of this cytokine were slightly but significantly elevated. These seemingly contrasting associations for two different proinflammatory cytokines are not easily resolvable. IL-12 is required for optimal IFN- γ production *in vivo* during immune responses, particularly during bacterial or parasitic infections (41). Circulating monocytes are the primary source of bioactive IL-12p70, in response to which NK cells readily produce IFN- γ , activating macrophages and enhancing their bactericidal activity and providing a mechanism of T-cell-independent macrophage activation during the early phases of innate resistance to infections (42). Separately, the ability of IL-12 to induce and maintain antigen-specific Th1-type responses is essential to control infections with many microbial pathogens (41, 43). We can only speculate that pregnancy-related and *P. falciparum* infection-related modulation of the production of different cytokines, including but not exclusive to Th1- and Th2-type responses, differentially affect their systemic levels depending on gestational age, for example, but also on the degree of chronicity of the infection. Successful pregnancy is characterized by a shift of the Th1/Th2 balance with a decrease of Th1-type cytokines and an increase in Th2-type cytokines. High circulating levels of IL-10 would be expected to inhibit monocyte activation and Th1-type cytokine synthesis, while low systemic levels of IL-12 in the face of elevated IL-10 levels are a feature of severe malaria in children (44, 45). Furthermore, downregulated IL-12p70, resulting from reduced transcription of its component IL-12p40, has been shown to be correlated with the uptake of *P. falciparum* hemozoin pigment and elevated levels of IL-10 in children with severe malarial anemia (46). Whether such mechanisms influence responses during the predominantly uncomplicated infections associated with pregnancy remains unknown.

We were particularly interested in the circulating cytokine profiles associated with the risk of preterm birth or small-for-gestational-age babies independently of *P. falciparum* infection and anemia. As already mentioned above, multivariate analysis revealed a significantly increased risk of preterm birth associated with increased levels of IL-12p70 at inclusion into the study, while the same association was also found for increased IL-5 and IL-10 levels at ANV4. Conversely, increased levels of IL-12p70 and IL-4

at ANV4 were found to be associated with a significantly reduced risk of preterm birth, as were increased levels of IL-5 at delivery. Many studies have reported that proinflammatory cytokines, such as IL-12, are implicated in the pathogenesis of poor pregnancy outcomes (29, 47, 48). However, most of those reports focused on peripheral or placental levels of cytokines at delivery. In the longitudinal study reported here, we know that between inclusion and ANV4, the women received 2 curative doses, spaced at least 1 month apart, of the antimalarial drug combination sulfadoxine-pyrimethamine. Thus, at least in those harboring *P. falciparum* infections when taking the treatment, it is plausible that the clearance of the parasites during that interval will have led to a change in the circulating cytokine profile, possibly explaining the contrasting associations observed at the 2 different time points during pregnancy.

We found that an increased risk of delivering an SGA baby was associated with increased levels of IL-5 at inclusion but that increased levels of the same cytokine at delivery were, conversely, associated with a significantly reduced risk of having a baby who was SGA, with the obverse clearly being that low levels of IL-5 were associated with an increase in such a risk. Thus, the latter finding is entirely consistent with the observation in our earlier study, namely, that low levels of IL-5 in placental plasma equated to an increased risk of having an SGA baby. In that study, we also observed the same association with increased risk of SGA babies for low levels of placental IFN- γ , but this was not the case for the levels of circulating IFN- γ assessed here. Nonetheless, it is striking that the circulating levels of the same cytokine, IL-5, measured at delivery appear here to distinguish two groups with distinctly different poor pregnancy outcomes, i.e., those with low circulating levels of IL-5 at delivery were at greater risk of either PTB or SGA. Whether the immunosuppressive activity of infection-induced IL-10 plays a determining role in this scenario and precisely how the suppression of a Th2-type cytokine might be mechanistically linked to either outcome of pregnancy are questions that remain open to speculation.

There are some limitations to our study that deserve mention. Although data from women found to be seropositive for HIV were excluded, the scope of the STOPPAM study did not allow for the detection of other coinfections, i.e., those of bacterial or helminth origin, for example, which could have influenced the cytokine measurements. In addition, we were unable to include an assessment of the possible influence of submicroscopic infections with *P. falciparum*, since we did not have relevant data for all women at all time points. It is also plausible that intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp) with sulfadoxine-pyrimethamine could, through the clearance of parasites, have modified cytokine concentrations. In the latter context, it is salient to note that, on average, the STOPPAM participants received their first and second doses of IPTp at 21 and 26 weeks of gestational age, respectively, placing the second dose approximately 8 weeks prior to the ANV4 sampling for the study here. We speculate that such an interval is sufficiently long to preclude any direct influence of the treatment on cytokine concentrations.

MATERIALS AND METHODS

The participants for this study were drawn from the EU-funded STOPPAM (Strategies to Prevent Pregnancy-Associated Malaria) study cohort. The STOPPAM study was conducted in Benin from 2008 to 2012 and involved the recruitment of 1,037 pregnant women who were monitored until delivery. One of the primary stated goals of STOPPAM was to quantify the pathophysiological and immunological effects of PAM. The study was approved by the ethics committees of the Faculty of Health Sciences of the University of Abomey-Calavi in Benin and of the Institute of Research for Development (IRD) in France.

Study area. Participants were enrolled in three health centers with maternity clinics (Comé, Akodeha, and Ouedeme Pedah), located in the district of Comé in Mono Province, southwestern Benin. Comé is predominantly urban, while the two other centers are in rural settings and are located 10 km apart. The area is considered moderate for malaria transmission, with two peaks during the rainy seasons (April to July and October to November) (49).

Study design and population. Women with a gestational age of fewer than 24 weeks who were resident for more than 6 months within 15 km of the health center and who were planning to deliver in the hospital were included after having given written informed consent (50). They were monitored at each scheduled monthly antenatal visit (ANV) for clinical and biological information. From the second trimester onwards, and according to the national guidelines at the time, they received two doses of

sulfadoxine-pyrimethamine (SP) as part of intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp) spaced at least 1 month apart.

The current study involved a subgroup of 400 women selected according to the pathological outcomes of pregnancy in order to quantify cytokine levels in peripheral plasma samples. In this context, 4 groups were defined: women who experienced *P. falciparum* infection during pregnancy, mothers who had anemia during pregnancy, women with preterm births (PTB), and women who delivered babies who were small for their gestational age (SGA).

P. falciparum infection during pregnancy was defined as a positive thick blood smear after microscopic examination of peripheral blood. Examination for *P. falciparum* infection was routinely conducted at each ANV and during emergency visits. All infected women were treated with quinine or SP per national guidelines.

Maternal anemia was assessed at each ANV and was defined as a hemoglobin level of <10 g/dl. PTB babies were those born at a gestational age of <37 weeks, as defined by ultrasound examination conducted before 24 weeks of GA. SGA babies were those with fetal growth restriction classified according to sex-specific charts for birth weights in less than the 10th percentile of fetal weight for gestational age (51). Samples from confirmed HIV-positive patients were not used in this study.

Sample collection. Venous blood samples were collected from the women at each ANV in vacutainers with citrate phosphate dextrose adenine anticoagulant. After centrifugation, plasma samples were separated, aliquoted, and stored at -80°C until further use.

Plasma cytokine quantification. Plasma samples collected at inclusion (INC), ANV4 (4 months after inclusion), and at delivery (DEL) were thawed and were analyzed for cytokine detection. Levels of IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, and IFN- γ were assessed using Cytometric Bead Array (CBA) enhanced sensitivity technology (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Data were acquired by flow cytometry (BD FACSCalibur) and analyzed using FCAP Array software (BD, Soft Flow Hungary). The lower limits of detection were 0.072 pg/ml, 0.034 pg/ml, 0.007 pg/ml, 0.006 pg/ml, and 0.007 pg/ml for IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, and IFN- γ , respectively.

Statistical analysis. We considered three periods during the pregnancy follow-up: INC (enrolment in the study), ANV4, and DEL. We chose inclusion for the first period of pregnancy instead of trimester categorization, because few women were included in the study during the first trimester of their pregnancy.

The study population was stratified into subgroups according to clinical and other characteristics that comprised (i) infection with *P. falciparum*, (ii) maternal anemia, (iii) intrauterine growth restriction (assessed by SGA), and (iv) PTB.

Cytokine concentrations of the different groups were compared with a control group comprised of mothers who had no plasmodial infection, no anemia, and babies who (i) were delivered at term and (ii) had adequate birth weight for gestational age. In addition, cytokine concentrations were compared according to the number of *P. falciparum* infections that occurred during pregnancy. The nonparametric Kruskal-Wallis test was used for these comparisons. Bonferroni's correction was applied to correct for the high number of statistical tests. To identify independent associations between cytokine levels and either PAM or pregnancy outcomes, we performed multivariate analysis. Unsegregated data were used instead of segregated subgroups to determine the independent effect of PAM or each pregnancy outcome, adjusted on the basis of each of the others, on the cytokine concentrations. We then investigated the influence of PAM or anemia at a given time point on cytokine levels measured at the same time, and the association between the occurrence of PAM or anemia during pregnancy and the cytokine concentrations observed at delivery, using linear regression models. For the latter, cytokine concentrations at delivery were adjusted for the presence of *P. falciparum* infection at delivery. Subsequently, we investigated the influence of cytokine concentrations at inclusion on the occurrence of PAM or anemia during pregnancy using logistic and Poisson regression models. Here, cytokine levels were also adjusted for the presence of *P. falciparum* infection at inclusion. Finally, the relationships between PTB and SGA with cytokine levels measured during pregnancy and at delivery were determined using logistic regression models. All the tests were performed including at the first step with all the factors described. Covariates with *P* values of <0.2 were included in multivariate models as well as other factors of interest (*P. falciparum* infection, anemia, PTB, SGA, and cytokine levels at INC, ANV4, and DEL) for a stepwise analysis to find the best model. In the final multivariate analysis, the association between cytokine concentration at a given time point and *P. falciparum* infection or pregnancy outcome was validated if a *P* value of ≤ 0.05 was obtained. The occurrence of PAM or anemia is defined by the presence of PAM or anemia (at least one episode of PAM or anemia) and the number of episodes of *P. falciparum* infection or anemia during pregnancy. Other factors included in the models as covariates were gravidity, maternal age, gestational age, education level, IPT, number of ANV, birth weight, and use of bed nets. Some factors were used as categorical variables (number of anemia events, number of infections, maternal age, gestational age at inclusion, gravidity, number of IPTp, number of ANV, and birth weight). In all cases, we performed separate analyses for each time point. All statistical analysis was performed using Stata/IC version 13 (StataCorp LP, College Station, TX).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

The current study used plasma samples and clinical data collected in the context of the Strategies to Prevent Pregnancy-Associated Malaria (STOPPAM) project, supported by European Union Framework 7, contract number 200889.

We especially thank all the pregnant women who participated in the STOPPAM study. We are particularly grateful to Sem Ezinmegnon, Darius Sossou, Bertin Vianou, Odilon Nouatin, and Firmine Viwami for their contribution to the laboratory component of STOPPAM.

The work described here was supported by a Ph.D. scholarship awarded to Tatiana Hountohotegbe by the Islamic Development Bank.

REFERENCES

- World Health Organization. 2019. World malaria report 2019. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Zen M, Ghirardello A, Iaccarino L, Tonon M, Campana C, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Doria A. 2010. Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. *Swiss Med Wkly* 140:187–201. [smw-12597](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60771-7).
- Makrigiannakis A, Minas V. 2007. Mechanisms of implantation. *Reprod Biomed Online* 14:102–109. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60771-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60771-7).
- Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. 2011. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 1221:80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x>.
- Makkar G, Ng EHY, Yeung WSB, Ho PC. 2006. Reduced expression of interleukin-11 and interleukin-6 in the periimplantation endometrium of excessive ovarian responders during in vitro fertilization treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3181–3188. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0180>.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76–79. <https://doi.org/10.1038/359076a0>.
- Králíčková M, Šíma P, Rokyta Z. 2005. Role of the leukemia-inhibitory factor gene mutations in infertile women: the embryo-endometrial cytokine cross talk during implantation—a delicate homeostatic equilibrium. *Folia Microbiol (Praha)* 50:179–186. <https://doi.org/10.1007/BF02931563>.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O. 2006. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 12:1065–1074. <https://doi.org/10.1038/nm1452>.
- Chaouat G, Cayol V, Mairovitz V, Dubanchet S. 1999. Localization of the Th2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the fetomaternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas/Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 42:1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1999.tb00459.x>.
- Halonon M, Lohman IC, Stern DA, Spangenberg A, Anderson D, Mobley S, Ciano K, Peck M, Wright AL. 2009. Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort. *J Immunol* 182:3285–3293. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0711996>.
- Orsi NM, Tribe RM. 2008. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol* 20:462–469. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01668.x>.
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. 2010. Review article: Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 63:601–610. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x>.
- Flanagan KL, Halliday A, Burl S, Landgraf K, Jagne YJ, Noho-Konteh F, Townend J, Miles DJC, van der Sande M, Whittle H, Rowland-Jones S. 2010. The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. *Eur J Immunol* 40:1062–1072. <https://doi.org/10.1002/eji.200939638>.
- Rogerson SJ, Desai M, Mayor A, Sicuri E, Taylor SM, van Eijk AM. 2018. Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for an old problem. *Lancet Infect Dis* 18:e107–e118. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30066-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30066-5).
- Fried M, Duffy PE. 1996. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 272:1502–1504. <https://doi.org/10.1126/science.272.5267.1502>.
- Ayres Pereira M, Mandel Clausen T, Pehrson C, Mao Y, Resende M, Daugaard M, Riis Kristensen A, Spliid C, Mathiesen L, E Knudsen L, Damm P, G Theander T, R Hansson S, A Nielsen M, Salanti A. 2016. Placental sequestration of *Plasmodium falciparum* malaria parasites is mediated by the interaction between VAR2CSA and chondroitin sulfate A on syndecan-1. *PLoS Pathog* 12:e1005831. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005831>.
- Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, Chaouat G. 2001. *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *J Infect Dis* 183:1530–1534. <https://doi.org/10.1086/320201>.
- Miu J, Mitchell A, Ball H, Hunt N. 2006. Chemokines and malaria infection. *Curr Immunol Rev* 2:331–344. <https://doi.org/10.2174/1573395510602040331>.
- Conroy A, Serghides L, Finney C, Owino SO, Kumar S, Gowda DC, Liles WC, Moore JM, Kain KC. 2009. C5a enhances dysregulated inflammatory and angiogenic responses to malaria in vitro: potential implications for placental malaria. *PLoS One* 4:e4953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004953>.
- Taylor-Robinson AW, Smith EC. 1999. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunol Lett* 67:1–9. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(98\)00148-5](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(98)00148-5).
- Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE. 1998. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN- γ and TNF- α associated with pregnancy outcomes. *J Immunol* 160:2523–2530.
- Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, Meshnick SR. 1999. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis* 180:1987–1993. <https://doi.org/10.1086/315135>.
- Singh PP, Lucchi NW, Blackstock A, Udhayakumar V, Singh N. 2012. Intervillous macrophage migration inhibitory factor is associated with adverse birth outcomes in a study population in Central India. *PLoS One* 7:e51678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051678>.
- Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, Abrams ET, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME. 2003. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun* 71:267–270. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.267-270.2003>.
- Chène A, Briand V, Ibitokou S, Dechavanne S, Massougbojji A, Deloron P, Luty AJF, Gamain B, Fievet N. 2014. Placental cytokine and chemokine profiles reflect pregnancy outcomes in women exposed to *Plasmodium falciparum* infection. *Infect Immun* 82:3783–3789. <https://doi.org/10.1128/IAI.01922-14>.
- Brabin BJ. 1983. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ* 61:1005–1016.
- Beeson JG, Brown GV. 2002. Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell Mol Life Sci* 59:258–271. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8421-y>.
- Beeson JG, Duffy PE. 2005. The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. *Curr Top Microbiol Immunol* 297:187–227. https://doi.org/10.1007/3-540-29967-x_6.
- Fried M, Kurtis JD, Swihart B, Pond-Tor S, Barry A, Sidibe Y, Gaoussou S, Traore M, Keita S, Mahamar A, Attaher O, Demebele AB, Cisse KB, Diarra

- BS, Kanoute MB, Dicko A, Duffy PE. 2017. Systemic inflammatory response to malaria during pregnancy is associated with pregnancy loss and preterm delivery. *Clin Infect Dis* 65:1729–1735. <https://doi.org/10.1093/cid/cix623>.
30. Huynh B-T, Fievet N, Gbaguidi G, Dechavanne S, Borgella S, Guézo-Mévo B, Massougbdji A, Ndam NT, Deloron P, Cot M. 2011. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg* 85:214–220. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0103>.
31. Boström S, Ibitokou S, Oesterholt M, Schmiegelow C, Persson J-O, Minja D, Lusingu J, Lemnge M, Fievet N, Deloron P, Luty AJF, Troye-Blomberg M. 2012. Biomarkers of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy in women living in northeastern Tanzania. *PLoS One* 7:e48763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048763>.
32. Ibitokou SA, Boström S, Brutus L, Ndam NT, Vianou B, Agbowai C, Zin MA, Huynh BT, Massougbdji A, Deloron P, Troye-Blomberg M, Fievet N, Luty A. 2014. Submicroscopic infections with *Plasmodium falciparum* during pregnancy and their association with circulating cytokine, chemokine, and cellular profiles. *Clin Vaccine Immunol* 21:859–866. <https://doi.org/10.1128/CVI.00009-14>.
33. Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. 2008. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J* 7:26. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-26>.
34. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>.
35. Schandené L, Alonso-Vega C, Willems F, Gérard C, Delvaux A, Velu T, Devos R, de Boer M, Goldman M. 1994. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 152:4368–4374.
36. Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. 2000. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol* 30:1683–1690. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200006\)30:6<1683::AID-IMMU1683>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200006)30:6<1683::AID-IMMU1683>3.0.CO;2-A).
37. Dobaño C, Berthoud T, Manaca MN, Nhabomba A, Guinovart C, Aguilar R, Barbosa A, Groves P, Rodríguez MH, Jimenez A, Quimice LM, Aponte JJ, Ordi J, Doolan DL, Mayor A, Alonso PL. 2018. High production of pro-inflammatory cytokines by maternal blood mononuclear cells is associated with reduced maternal malaria but increased cord blood infection. *Malar J* 17:177. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2317-2>.
38. Nosten F, ter Kuile F, Maelankirri L, Decludt B, White NJ. 1991. Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85:424–429. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90205-D](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90205-D).
39. Newman RD, Hailemariam A, Jimma D, Degife A, Kebede D, Rietveld AEC, Nahlen BL, Barnwell JW, Steketee RW, Parise ME. 2003. Burden of malaria during pregnancy in areas of stable and unstable transmission in Ethiopia during a nonepidemic year. *J Infect Dis* 187:1765–1772. <https://doi.org/10.1086/374878>.
40. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoah K, Brabin B, Newman RD. 2007. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 7:93–104. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70021-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70021-X).
41. Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133–146. <https://doi.org/10.1038/nri1001>.
42. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E. 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 176:1387–1398. <https://doi.org/10.1084/jem.176.5.1387>.
43. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 153:2533–2543.
44. Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Weinberg JB, Kreamer PG. 2000. Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 68:3909–3915. <https://doi.org/10.1128/iai.68.7.3909-3915.2000>.
45. Perkins DJ, Weinberg JB, Kreamer PG. 2000. Reduced interleukin-12 and transforming growth factor- β 1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis* 182:988–992. <https://doi.org/10.1086/315762>.
46. Keller CC, Yamo O, Ouma C, Ong'echa JM, Ounah D, Hittner JB, Vulule JM, Perkins DJ. 2006. Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (il-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infect Immun* 74:5249–5260. <https://doi.org/10.1128/IAI.00843-06>.
47. El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. 2004. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 52:45–52. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00181.x>.
48. Raghupathy R, Al-Azemi M, Azizieh F. 2012. Intrauterine growth restriction: cytokine profiles of trophoblast antigen-stimulated maternal lymphocytes. *Clin Dev Immunol* 2012:734865. <https://doi.org/10.1155/2012/734865>.
49. Djènontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry M-C, Bousari O, Chabi J, Ossè R, Koudénoukpo S, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F. 2010. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): a pre-intervention study. *Parasit Vectors* 3:83. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-83>.
50. Huynh B-T, Fievet N, Gbaguidi G, Borgella S, Mévo BG, Massougbdji A, Deloron P, Cot M. 2011. Malaria associated symptoms in pregnant women followed-up in Benin. *Malar J* 10:72. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-72>.
51. Schmiegelow C, Scheike T, Oesterholt M, Minja D, Pehrson C, Magistrado P, Lemnge M, Rasch V, Lusingu J, Theander TG, Nielsen BB. 2012. Development of a fetal weight chart using serial trans-abdominal ultrasound in an east african population: a longitudinal observational study. *PLoS One* 7:e44773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044773>.

ARTICLE 2: PAMVAC placental malaria vaccine development: adjuvant choice affects the strength and duration of B and T cell responses

Tatiana Hountohotegbe^{1,2}, Komi Gbedande^{1*}, Déo-Gracias Berry^{1**}, Darius Sossou¹, Firmine Viwami¹, Euripide Avopkaho^{1,2}, Achille Massougbodji¹, Ali Salanti³, Morten A. Nielsen³, Benjamin Mordmüller⁴, Peter G. Kremsner⁴, Nadine Fievet², Adrian J.F. Luty²

Statut : *En préparation*

Présentation au congrès :

- Juin 2019 : 2019 Gordon Conference on Malaria, Les Diablerets, Suisse. Oral
- Novembre 2019: 68th Annual meeting of ASTMH, Gaylord National Resort and Convention Center, Washington DC, USA. Oral
- Novembre 2020 : 69th Annual meeting of ASTMH, Virtual meeting. Poster

Le PAG constitue un problème majeur de santé publique. Il est dû à l'adhésion et à la séquestration des globules infectés au niveau du placenta. Ce phénomène est favorisé par l'expression de la protéine VAR2CSA à la surface des globules rouges infectés. Le vaccin PAMVAC est une protéine recombinante comprenant les domaines ID1-ID2a de VAR2CSA. Les essais précliniques ont révélé que l'antigène vaccinal induit des anticorps bloquant l'adhésion des globules infectés à la CSA placentaire (324,331). De plus, il a été observé lors d'une étude pilote menée chez des femmes au cours de leur première grossesse une augmentation de la fréquence des cellules mémoires spécifiques de l'antigène vaccinal (329). L'efficacité d'un vaccin contre le PAG, repose sur l'amplitude et la longévité d'une réponse anticorps bloquant la séquestration au niveau du placenta.

L'objectif du travail présenté ici est d'étudier l'immunogénicité du candidat vaccin PAMVAC à travers l'évaluation de la réponse mémoire cellulaire induite par la vaccination. Pour cela, 21 femmes nulligestes ont été suivies au cours de l'essai clinique de phase Ib au Bénin. Les cellules mononuclées récoltées à partir du sang veineux périphérique des volontaires ont été congelées successivement à J0, J56, J84 et J168 au cours du suivi. Les réponses des cellules T mémoires ont été évaluées grâce au dosage des cytokines dans le surnageant de culture des cellules mononuclées par la cytométrie en flux. La réponse des lymphocytes B mémoires a été étudiée grâce à la détermination de la fréquence des cellules sécrétrices d'anticorps en utilisant

la technique de l'ELISpot. Les phénotypes des différentes populations de cellules mémoires ont été analysés par la cytométrie en flux.

En général, le vaccin PAMVAC est immunogénique et bien toléré. Une élévation de la concentration des cytokines de type Th1 et Th2 a été observée après l'injection de PAMVAC. De même une augmentation de la fréquence des cellules sécrétrices d'anticorps a été notée chez les volontaires vaccinées particulièrement avec l'adjuvant GLA-SE. Par ailleurs, la population de lymphocytes Tfh 'Superior B cell helper' prédominait également dans le groupe GLA-SE. Nos résultats améliorent les connaissances sur réponses immunitaires induites par la vaccination contre le PAG. Ils suggèrent également l'importance du choix de l'adjuvant pour la poursuite du développement du candidat vaccin PAMVAC.

1 Title

2 Adjuvant choice affects the strength and duration of B and T cell responses to a placental
3 malaria vaccine

4

5 Authors

6 Tatiana Hountohotegbe^{1,2}, Komi Gbedande^{1*}, Déo-Gracias Berry^{1**}, Darius Sossou¹, Firmine
7 Viwami¹, Euripide Avopkaho^{1,2}, Achille Massougbodji¹, Ali Salanti³, Morten A. Nielsen³,
8 Benjamin Mordmüller⁴, Peter G. Kremsner⁴, Nadine Fievet², Adrian J.F. Luty²

9

10 Affiliations

11 ¹*Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Abomey-Calavi, Benin*

12 ²*Université de Paris, MERIT, IRD, F-75006 Paris, France*

13 ³*Centre for Medical Parasitology, Department of Immunology and Microbiology, University of
14 Copenhagen and Department of Infectious Diseases, Copenhagen University Hospital,
15 Copenhagen, Denmark.*

16 ⁴*Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen and Deutsches Zentrum für
17 Infektionsforschung, Tübingen, Germany*

18 *Current address: University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA

19 **Current address: University of Munich.....

20

21 Corresponding author: Tatiana Hountohotegbe, IRCB, IRD MERIT UMR 261 Mère et enfants
22 en milieu tropical, 08 BP 841 Cotonou, Benin

23 hountotatiana@gmail.com

24

25 Abstract

26 Pregnancy-associated malaria due to *Plasmodium falciparum* infection often leads to poor
27 pregnancy outcomes, and is as such a major public health issue in countries where *P.*
28 *falciparum* is endemic. The parasite expresses a particular variant protein, VAR2CSA, that
29 mediates adhesion and sequestration of infected erythrocytes in the placenta via its
30 interaction with chondroitin sulphate A (CSA) on syncytiotrophoblasts. An effective vaccine
31 would elicit functional, long-lasting antibody-based immune memory responses capable of
32 inhibiting the CSA-VAR2CSA interaction, thereby preventing placental infection. We tested
33 such a vaccine, known as PAMVAC, comprising the N-terminal ID1-DBL2-ID2a domain of
34 VAR2CSA as a recombinant protein, in a randomized, double-blind Phase Ib trial in healthy,
35 nulligravid adult Beninese. Groups of women were immunized with PAMVAC, formulated
36 with either GLA-SE or alhydrogel as adjuvant, via the intramuscular route on 3 occasions
37 spaced 1 month apart, whilst a placebo group received physiologic isotonic solution. The
38 vaccine was shown to be safe and immunogenic. Here, we report the results of investigation
39 of the cellular immune responses induced by PAMVAC. Peripheral blood mononuclear cells
40 were isolated from sequential venous blood samples and used to evaluate vaccine antigen-
41 specific T and B lymphocyte responses over time using flow cytometric and ELISpot assays.
42 PAMVAC enhanced both Th1- and Th2-type cytokine activity in T cells, whilst memory B cell
43 responses increased after vaccination and persisted over time. Compared to the PAMVAC-
44 alhydrogel group, the frequency of memory B cell responses was appreciably higher in the
45 PAMVAC-GLA-SE group. In the latter group, in addition, Th2-polarized follicular helper T cells
46 predominated, a profile not seen in the alhydrogel group. These findings provide important
47 insights into the cellular immune response profiles related to PAMVAC vaccination,
48 highlighting the potential importance of adjuvant choice in further clinical development of
49 the vaccine.

50 Keywords: Pregnancy-associated malaria, vaccine, VAR2CSA, cellular immune responses,
51 Phase I clinical trial

52 Background

53 Pregnancy-associated malaria (PAM), due to infection with *Plasmodium falciparum*, is a
54 major public health problem especially in sub-Saharan Africa, where up to 30 million
55 pregnancies are at risk of placental malaria infections each year¹. PAM is often
56 asymptomatic, but it frequently leads to various pathological syndromes resulting from the
57 expression of *P. falciparum*-derived antigens on the surface of infected erythrocytes (*Pf*-
58 iRBC) that are responsible for their adherence and sequestration in the placenta². The
59 location of the infection in the placenta poses a diagnostic problem and delays
60 management^{3,4}. There can be fatal consequences for both mother and fetus^{5,6}.

61 The adhesion of *Pf*-iRBC to chondroitin sulphate A (CSA) expressed by placental
62 syncytiotrophoblasts is primarily mediated by the VAR2CSA protein, a member of the
63 *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*Pf*EMP1) family of variant surface antigens
64 (VSA) encoded by *var* genes^{2,7}. VSA are essentially parasite virulence factors that are
65 exported to, and anchored in the *Pf*-iRBC membrane, where they mediate adhesion to a
66 variety of endothelial cell surface receptors. VAR2CSA is preferentially expressed by
67 parasites isolated from placental tissues and by isolates selected to bind to CSA^{8,9}. The main
68 protective mechanism that develops in women after second and subsequent pregnancies is
69 thought to be the VAR2CSA-specific antibody-mediated inhibition of binding of *Pf*-iRBC to
70 placental CSA¹⁰. A vaccine that prevents PAM would reduce maternal and neonatal mortality
71 and morbidity, complementing and augmenting existing measures to prevent PAM and its
72 complications that include insecticide-treated bed nets and chemoprevention with anti-
73 malarial drugs.

74 PAMVAC is a vaccine based on the VAR2CSA protein of the FCR3 parasite strain, comprising a
75 73 kDa recombinant protein corresponding to an N-terminal fragment (ID1-ID2a) of
76 VAR2CSA that encompasses the DBL2 domain. In preclinical animal models this protein was
77 shown to induce functional adhesion-blocking antibodies that target a minimal CSA-binding
78 region of VAR2CSA⁷. The goal of an effective vaccine against PAM is the induction of an
79 antibody response that is both protective and durable. In this context, preclinical tests

80 conducted with PAMVAC also showed that it induces adhesion-blocking antibodies with
81 strain-transcending activity¹¹.

82 A pilot study on the construction of VAR2CSA-specific immunological memory following
83 natural exposure to infection with *P. falciparum* among Beninese primigravid women
84 showed an acquisition of memory B cells with specificity for the PAMVAC vaccine antigen¹².
85 In addition, recent data from a Phase Ia study of PAMVAC conducted in Germany revealed
86 the good safety and tolerance profile of the vaccine when formulated with either alum, with
87 a squalene oil-based Glucopyranosyl Lipid Adjuvant-stable emulsion (GLA-SE) or with a
88 liposomal adjuvant containing saponin QS21 (GLA-LSQ). The vaccine was shown to be
89 immunogenic, particularly in the GLA-SE group, and the antibodies generated inhibited the
90 adhesion to CSA of *Pf-iRBC* expressing VAR2CSA¹³.

91 Here, we quantified vaccine antigen-specific T and B cell memory responses and the cellular
92 phenotypes present in peripheral blood of vaccinees during a Phase Ib clinical trial of
93 PAMVAC in healthy Beninese nulligravidae. The primary objective of the present work was to
94 explore in detail the cellular immunological responses to the vaccine in order to better
95 understand its immunogenicity and the longevity of the vaccine-induced responses in
96 humans, focusing on comparison of the two adjuvants used.

97

98 Methods

99 ***Study design***

100 This Phase Ib study was part of a two-center, double-blinded, placebo-controlled,
101 randomized clinical Phase 1 vaccine trial. It was conducted at the “Institut de Recherche
102 Clinique du Bénin” (IRCB) in Abomey-Calavi, Benin, between November 2016 and August
103 2017 following the Phase Ia trial in Tübingen, Germany. Abomey-Calavi is a malaria endemic
104 area with peaks of transmission during the two rainy seasons (from April to July, and from
105 September to November). Eligible nulligravid volunteers were assigned to one of three

106 groups. Two groups were vaccinated with 50µg of PAMVAC, adjuvanted with either
107 alhydrogel or with GLA-SE (n=9 per group), while a group of three volunteers received a
108 placebo (isotonic saline solution). Vaccine was administered by intramuscular injection in the
109 deltoid three times at days 0, 28 and 56. The volunteers were followed-up weekly and
110 monthly following each immunization until the long-term visits at days 168 and 252 post-
111 first vaccination.

112 All the women included in the study received contraception by injection before and during
113 the follow-up. Pregnant women, any confirmed or suspected immunosuppressive or
114 immunodeficient state, and women infected with either HIV, or Hepatitis (B/C) virus were
115 excluded.

116 The clinical trial was approved by the ethics committee of the Faculty of Health Sciences of
117 the University of Abomey-Calavi, Benin. It was conducted according to International Council
118 for Technical Requirements for Human Use guidelines and the principles of the Declaration
119 of Helsinki.

120 ***PAMVAC Vaccine***

121 PAMVAC is a subunit vaccine candidate comprising the recombinant ID1-DBL2-ID2a domains
122 of the FCR3 variant of VAR2CSA. The vaccine (Expres2sion, Denmark) and the adjuvants
123 Alhydrogel (Brenntag, Denmark), GLA-SE (Infectious Disease Research Institute, USA) were
124 manufactured as described previously¹³. The drug product vials were stored at -20°C and the
125 adjuvants at 2-8°C. An independent pharmacist team prepared the syringes containing either
126 50µg PAMVAC or isotonic saline solution (NaCl 0.9% for injection). Each 50µg PAMVAC dose
127 was mixed with either 0.43mg Alhydrogel or 2.5µg GLA containing 2% squalene (GLA-SE).

128 ***Other antigens***

129 A PfEMP1-derived antigen CIDR1a (kindly provided by CMP, University of Copenhagen,
130 Denmark), representing a VSA not involved in the interaction with CSA in the placenta during
131 PAM, was expressed using a Baculovirus expression vector system¹¹. Total anti-human IgG

132 antibody and Tetanus toxoid (TT, Statens Serum Institute, Denmark) were used as positive
133 controls for antibody secretion measurement. Phytohemagglutinin-L (PHA-L, Sigma Aldrich)
134 served as positive control for cytokine quantification following PBMC stimulation.

135 ***Blood collection and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) preparation***

136 Peripheral venous blood samples (27 ml) were collected into sterile blood collection tubes
137 containing citrate phosphate dextrose adenine (CPDA) at 4 different times during the follow-
138 up (Days -1, 56, 84, 168). The samples were transported within 4 h to the laboratory of the
139 Research Centre for Malaria during Pregnancy and Infancy (CERPAGE). PBMC were
140 immediately isolated by density gradient centrifugation on Ficoll (Fisher Scientific, UK), and
141 resuspended in cryopreservation medium comprising 90% fetal calf serum (FCS, Sigma)
142 supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, SIGMA). They were then frozen in
143 aliquots (5×10^6 up to 10×10^6 cells per cryovial) at -80°C in isopropanol for 12 h, and
144 subsequently stored under liquid nitrogen. Subsequently, cryopreserved PBMC were thawed
145 quickly in a 37°C water bath and diluted slowly with warm complete medium (37°C). After
146 spin-washing twice with warm complete medium (37°C) to remove DMSO, viable cells were
147 counted and resuspended at 10^6 cells/ml for the quantification of memory B and T cell
148 responses to different antigens. Complete medium for specific antibody secreting cells
149 quantification comprised RPMI 1640 without L-Glutamine (Sigma) containing 1% sodium
150 pyruvate 100 mM (Fischer), 1% MEM non-essential amino acids 100 mM (Fischer), 1% L-
151 Glutamine 200 mM (Fischer), 1% penicillin (10.000 IU/ml) - streptomycine (10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
152 (Fischer), 1% 2- mercapto-ethanol 50 mM (Fischer) and 10% heat-inactivated FCS (Sigma).
153 For T cell activity, complete medium comprised RPMI 1640 without L-Glutamine (Sigma),
154 10% heat-inactivated FCS (Sigma), 1% 200 mM L-Glutamine (Fischer) and 1% penicillin-
155 streptomycin (Fischer). Complete medium for PBMC thawing prior to B and T cell
156 immunophenotyping comprised RPMI 1640 without L-Glutamine (Sigma) supplemented with
157 1% sodium pyruvate 100 mM (Fischer), 1% MEM non-essential amino acids 100 mM
158 (Fischer), 1% L-glutamine 200 mM (Fischer) and 10% heat-inactivated FCS (Sigma).

159

160 ***Immunological investigations***

161 *Quantification of cytokine in culture supernatant*

162 2×10^5 PBMCs were cultured in 96 well plates (Dutscher) in 200 μ l of complete medium. Cells
163 were either left unstimulated or were stimulated with either mitogen (PHA-L 1 μ g/ml), or
164 with PAMVAC (10 μ g/ml) recall antigen. Cell cultures were incubated for 72 h at 37°C in an
165 atmosphere containing 5% CO₂. Cell-free culture supernatants (150 μ l) were collected after
166 centrifugation of the plate (at 450g for 5 min) and subsequently stored as 50 μ l aliquots at -
167 80°C prior to thawing for cytokine measurements. We quantified IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ ,
168 and TNF- α in culture supernatants using a commercially available cytometric bead array
169 (CBA soluble protein Flex set assay; BD Biosciences, Grenoble, France), conducted according
170 to the manufacturer's instructions. The bead assay sample data were collected on a FACS
171 Canto II 10-color cytometer (BD Biosciences). The assay's lower limit of detection (LLOD) was
172 1.1 pg/ml, 1.6 pg/ml, 0.13 pg/ml, 0.6 pg/ml, 0.8 pg/ml and 1.2 pg/ml for IL-5, IL-6, IL-10, IL-
173 13, IFN- γ and TNF- α respectively. Results were formatted using the BD CBA analysis software
174 (FCAP array). The concentrations of IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α in placenta/peripheral
175 plasma have been previously shown to be associated with PAM^{3,9-12}. Therefore, those
176 cytokines were chosen to assess PAMVAC-induced T cell responses.

177 *Frequencies of specific antibody-secreting cells*

178 10^6 PBMC were cultured in 1 ml of complete medium under the conditions described above
179 over 5 days in the presence of CpG ODN2006 (2.5 mg/ml, sigma) and IL-15 (2 mg/ml, R&D
180 Systems Europe) for B cell differentiation into antibody secreting cells. On the 6th day, the
181 PBMC were harvested by pipetting and washed in warm complete medium for plating into
182 antigen coated plates. The antigens PAMVAC (10 mg/ml), CIDR1a (10 mg/ml) and TT (5
183 mg/ml) and the anti-human IgG antibody (5 mg/ml) were added to separate wells of pre-
184 wetted ELISpot plates (Millipore Multiscreen, Dominic Dutscher, France), that were then
185 incubated overnight at 4°C. Plates were then washed twice and blocking buffer added (3%
186 bovine serum albumin [Sigma] in sterile PBS) for 30 min at room temperature. Plates were

187 then washed twice with sterile PBS. Stimulated PBMC were then plated for each antigen as
188 follows: 2×10^5 PBMC in five wells for PAMVAC and CIDR1a antigens, 2×10^5 PBMC in four
189 wells for TT, 2×10^5 PBMC in duplicate in blank wells as a negative control, and 2×10^4 PBMC in
190 duplicate for total cells producing IgG. Seven serial dilutions (1:2) were performed for the
191 duplicate IgG wells. Plates with cells were incubated overnight in an incubator (37°C, 5%
192 CO₂). After five washes with washing buffer (PBS with 3% BSA and 0.5% Tween-20), goat
193 anti-human IgG biotin (Sigma) diluted 1/500 in PBS/3% BSA was added to the wells, and
194 plates incubated for 2h at room temperature. Plates were washed five times again with
195 washing buffer and Extravidin (Sigma) diluted 1/600 in PBS/3% BSA was added to wells. After
196 1h incubation, the plate was washed three times with PBS before developing with AEC (3-
197 Amino-9-ethylcarbazole) substrate for 10min incubation. The plate was finally washed in
198 deionized water to stop the reaction. Plates were scanned and the number of spots
199 representing antigen-specific antibody secreting cells quantified using an ImmunoSpot® S6
200 Ultra-V analyzer I (CTL Europe GmbH).

201 *Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping*

202 PBMC were washed and labeled with fixable viability dye, efluor506 (ebiosciences), to
203 determine their viability according to the manufacturer's instructions (Thermofisher).
204 Immunophenotyping of T and B cells was then carried out by extracellular labelling with
205 monoclonal antibodies from ebiosciences and Invitrogen. Anti-CD4-FITC, anti-CD3-APC-eF780,
206 anti-CD8-AF700, anti-CD45-PerCP-eF710, anti-CD27-SB436, anti-CD183-PE-Cy7, anti-CD185-
207 SB600 and anti-CD279-APC antibodies were used for the characterization of T cell
208 subpopulations. In addition, anti-CD19-eF450, anti-CD20-FITC, anti-CD21-APC, anti-CD10-
209 SB600, anti-CD27-PE-Cy7, anti-CD38-PerCP-eF710 and anti-CD268-PE antibodies were used
210 to determine phenotypes of B cell subsets. Cells were collected on a FACS Canto II 10-colour
211 cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (version 10). Combinations of the
212 characteristic clusters defined the cell phenotypes. Thus, among T cells, the different subsets
213 were defined as follows: Naive T cells (NTC) CD3⁺CDR45RA⁺CD27⁺CCR7⁺, memory T cells
214 (MTC) CD3⁺CDR45RA⁻, central memory T cells (TCM) CCR7⁺CDR45RA⁻CD27⁺, effector memory
215 T cells (TEM) CCR7⁻CDR45RA⁻CD27⁻, terminally- differentiated effector memory T cells

216 (TEMRA) CCR7-CDR45RA+CD27-, follicular T helper cells (Tfh) CXCR5+CDR45RA-CD4+. Within
217 the Tfh, the expression of CXCR3 was distinguished between 'Superior B cell helper' Tfh2
218 (PD1+CXCR3-) and 'Inferior B cell helper' Tfh1 (PD1+CXCR3+). Similarly within the B cell
219 population different phenotypes were determined: immature B cells (iBC) CD19+CD10+,
220 mature B cells (mBC) CD19+CD10-, naive B cells (NBC) CD19+CD10-CD27-CD21+, activated B
221 cells (ABC) CD19+CD20+CD10-CD27+CD21-CD38-, intermediate memory B cells
222 CD19+CD20+CD10-CD27+CD21-CD38+, plasma cells CD19+CD20-CD10-CD27+CD21-CD38^{high},
223 classical memory B Cells (cMBC) CD19+CD10-CD27+CD21+ and atypical memory B cells
224 (aMBC) CD19+CD10-CD27-CD21-.

225 **Statistics**

226 The study is a first proof-of-concept Phase I clinical trial. Hence, sample size was chosen to
227 allow detection of large differences in adverse event patterns. Here, we report the results of
228 exploratory endpoints of the study. Therefore, the small sample size does not allow for the
229 detection of small differences in the immunological parameters assessed. All the statistical
230 modeling was therefore exploratory. Stata 13, StataCorp LLC (College Station, Texas) and
231 GraphPad Prism V5 (San Diego, CA) were used for statistical tests. Cytokine levels were
232 compared by antigen according to the groups using the non-parametric Kruskal-Wallis test in
233 univariate analysis. The subsequent immune responses were compared between a given
234 time-point and baseline (Day -1) using the Wilcoxon rank sum test. A Bonferroni correction
235 was applied due to multiple comparisons.

236

237 **Results**

238 **Study population**

239 Figure 1 shows the flow chart of the study. Among the 21 volunteers recruited, 9 received 50
240 µg of PAMVAC with Alhydrogel as adjuvant, 9 received 50 µg of PAMVAC with GLA-SE as
241 adjuvant, and 3 received the placebo. Vaccinations were given on 3 separate occasions

242 between 3rd November 2016 and 31st January 2017, within pre-specified windows of 28-35
243 days. The characteristics of the participants are shown in Table 1. At enrolment, the mean
244 ages (minimum; maximum) were 19 (18; 21), 20 (18; 24), 21 (20; 22) respectively for
245 Alhydrogel, GLA-SE and Placebo groups. Overall, the body mass indices (BMI) were below 30
246 kg/m², except for two volunteers (30.11 and 33.96 in the Alhydrogel and Placebo groups,
247 respectively), and one with 17.27kg/m² who was a GLA-SE vaccinee. (Table 1)

248

249 **Cytokine responses following immunization**

250 All six cytokine concentrations were quantified in culture supernatants at D-1, D56, D84, and
251 D168. Data are presented as delta values after subtraction of cytokine concentrations in the
252 supernatants of non-stimulated PBMCs from those in supernatants of stimulated cells
253 (PAMVAC and PHA). Overall, non-significant increases of the cytokine levels were observed
254 after non-specific and PAMVAC-antigen stimulation in PBMCs collected at D56 compared
255 with D-1 among volunteers who received the PAMVAC vaccine. (Fig. 2)

256 In response to non-specific stimulation, the levels of IL-10, IL-13, TNF- α and IFN- γ tended to
257 increase in the GLA-SE group (TNF- α p value = 0.022) and were sustained up to D168. There
258 was also a slight increase of non-specific IL-6 levels in the Alhydrogel group while IL-5
259 decreased at D84.

260 Following PAMVAC immunizations, Th2-type PAMVAC-specific cytokine responses showed
261 non-significant trends to increase after vaccination. IL-5 concentrations were increased 5-7
262 fold at D84 with Alhydrogel whereas IL-13 levels decreased in that group at D84. Vaccine-
263 specific IL-10, IFN- γ and TNF- α concentrations varied only slightly in both adjuvant groups.

264 In the placebo group (data not shown), cytokine responses did not change after vaccination.
265 (Fig. 2)

266

267 **Specific antibody-secreting cell frequencies increased after immunization**

268 The frequency of IgG secreting cells was analyzed at days -1, 56, 84 and 168. In the
269 Alhydrogel group, the frequency of PAMVAC-specific IgG-secreting cells increased
270 significantly at D168, but there were no changes in the frequencies of cells secreting IgG of
271 other specificities. In the GLA-SE group the frequency of B cells secreting IgG with specificity
272 for PAMVAC increased significantly between baseline and D56 and were maintained at the
273 same level through to D168 (PAMVAC $p=0.00125$, $p=0.008$, $p=0.0015$ at D56, D84, D168,
274 respectively). In the same group, the frequency of IgG-secreting B cells overall increased
275 significantly between baseline and D84 (total IgG $p=0.0035$, Fig. 3), whilst for CIDR1 α and TT
276 no changes were noted. In the Placebo group, no significant changes were noted for any B
277 cell population at any time (Fig. 3).

278 **Memory B and T cell phenotypes in the study population**

279 *CD4 and CD8 T cell subsets*

280 We assessed whether the immunization with PAMVAC vaccine candidate could influence the
281 phenotype of certain sub-populations within PBMC (Fig. 4). Preliminary results indicated a
282 non-significant increase in CD4⁺ NTCs at D56 but their proportion decreased one month later
283 below the starting threshold in the volunteers who received PAMVAC. In contrast, the
284 frequency of CD8⁺ NTCs decreased after vaccination with GLA-SE group.

285 Concerning memory T cell populations, both CD4⁺ TCM and TEM were almost unchanged in
286 both adjuvant groups. However, the proportions of CD8⁺ TEM were higher than CD8⁺ TCM
287 although their level decreased after vaccination (Fig. 4). In the placebo group, the frequency
288 of CD8⁺TEMs, decreased significantly up to D84 (Fig. 4). TEMRA of either type were
289 undetectable.

290 *Follicular T helper cells (Tfh)*

291 The phenotype of Tfh cells was determined at four time points in the PBMC of the
292 volunteers, as shown in Figure 5. In the Alhydrogel group the frequencies of either

293 CD4⁺CXCR5⁺ or differentiated CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺ cells showed no marked changes over the
294 whole study period. In the GLA-SE group no statistically significant changes were noted, but
295 there were trends for the frequency of CD4⁺CXCR5⁺ cells to decline from baseline to D56,
296 and for that of CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺ cells to decline from baseline to D84. The expression of
297 CXCR3 on PD1⁺ Tfh cells is presented as a ratio between the Tfh2 and Tfh1 subpopulations
298 (number of Tfh2/number of Tfh1). Overall, a ratio above 1 was observed after the 2nd
299 vaccination. Although non-significant, a higher ratio was found throughout the period of
300 observation in the GLA-SE group. With Alhydrogel no such trend was observed (Fig. 5).

301 *B cell subsets*

302 Changes in the frequencies of different circulating memory B cell sub-populations are
303 illustrated in Figure 6. The principal differences between the two adjuvant groups concerned
304 the profiles of activated B cells that declined from baseline to D56, subsequently recovering
305 in the GLA-SE group but not in the Alhydrogel group. The frequencies of plasma cells
306 increased in both groups from baseline to D56, subsequently decreasing through to D168 in
307 the GLA-SE group but not in the Alhydrogel group. In the latter group the change in plasma
308 cell frequency was paralleled by a decline over time in the frequency of classical (cMBC)
309 memory B cells, whilst the opposite was the case in the GLA-SE group, in which the decline in
310 plasma cell frequencies over time after D56 was accompanied by an increase in the
311 frequency of cMBC. There were some changes in the frequencies of atypical memory B cells
312 (aMBC) in both adjuvant groups, but no marked differences in the profiles between the two.

313

314 **Discussion**

315 We describe here the cellular immunological responses to vaccination in volunteers residing
316 in a malaria endemic area during the first-in-human Phase Ib trial of a placental malaria
317 vaccine. The study was designed primarily to assess the safety and tolerability of the vaccine.
318 Amongst the exploratory aims of the study were assessments of vaccine-specific T and B cell

319 responses as adjunct measures of vaccine immunogenicity allied to the determination of
320 vaccine-induced humoral responses.

321 Measuring memory T cell responses during and after vaccination is a necessary step in
322 establishing a vaccine's immunogenicity¹⁴. Factors that are important in the measurement of
323 T cell responses include the methods employed, the timing, and the sample type. T cell
324 responses measured in systemic blood samples during a vaccination regimen tend to follow
325 the typical pattern of an adaptive immune response. In this context we assessed specific
326 memory T cell cytokine responses in the culture supernatants of stimulated PBMC. We
327 observed some trends towards elevated levels of both Th1- and Th2-type cytokines in
328 response to non-specific mitogen and vaccine antigen stimulation. In our previous study
329 assessing the specific responses to the DBL5 domain of VAR2CSA, enhanced Th1-type
330 cytokines were associated with infection during pregnancy¹⁵. Higher mitogen-induced Th2-
331 type cytokines levels were also reported in that study as well as at delivery in a cohort of
332 primigravid women naturally exposed to *P. falciparum* infection^{12,15}. In addition, both
333 PAMVAC specific Th1 and Th2 cytokine concentrations measured here seemed to be higher
334 than those observed among primigravid women¹². However, the response differs according
335 to the adjuvant used in the formulation. IL-5 and IL-13 concentrations were higher in the
336 PAMVAC-Alhydrogel group. Alhydrogel is an aluminium hydroxide gel widely used over 80
337 years as adjuvant in vaccines licensed for use in humans¹⁶. Aluminium adjuvants are known
338 to augment type-2 responses with less cellular mediated immune responses¹⁷. Although we
339 did not assess differences in the responses between adjuvants using statistical methods, the
340 magnitude of type-2 cytokine responses appeared higher following immunization with
341 PAMVAC-Alhydrogel than with GLA-SE.

342 B cell responses determined using ELISpot assays revealed that PAMVAC vaccination induced
343 memory B cell responses that increased noticeably after the second dose of vaccine and
344 persisted over time at levels equivalent to or substantially higher than those we have
345 previously measured in primigravid Beninese (≈ 20 spots/million of PBMC). Of note, the post-
346 vaccination frequency of PAMVAC-specific IgG-secreting B cells increased rapidly from
347 baseline to D56 in the group given vaccine with the GLA-SE adjuvant, reaching a plateau level

348 that was both sustained and markedly higher than the level in those who received vaccine
349 with Alhydrogel. These findings are consistent with the high PAMVAC-specific IgG plasma
350 levels observed four weeks after the last vaccination of naïve German volunteers who
351 received PAMVAC with GLA-SE¹³. Whether the induced vaccine antigen-specific antibody
352 responses display differential functional activity as a function of the adjuvant used is the
353 subject of an on-going study.

354 Immunization with PAMVAC did not markedly modify B cell responses to other antigens.
355 Tetanus toxoid (TT) was used as control since it is given routinely to pregnant women as part
356 of the standard primary health care package. Thus, as expected, the frequencies of TT-
357 specific IgG secreting cells did not change significantly in any vaccinee group. Since the
358 intention is that any PAMVAC-like vaccine should be administered to young girls before their
359 first pregnancy, it is important to evaluate the potential effect of PAMVAC on the responses
360 to vaccines administered during pregnancy. Similarly to TT, B cell responses to the PAM-
361 unrelated CIDR1 α antigen, also included as a control, were also unchanged among the
362 vaccinees, as was expected. This antigen plays a role in cytoadherence to endothelial
363 receptors during infections in non-pregnant hosts, and thus has no role to play during
364 PAM^{18,19}. Importantly, PAMVAC-specific B cell responses were undetectable throughout the
365 time course of study in the placebo group of nulligravid Beninese, as well as at baseline, pre-
366 vaccination, in the two other groups, all of whom have been exposed to infection with *P.*
367 *falciparum* since birth. These findings need to be corroborated through antibody
368 quantification in the plasma of the same volunteers.

369 Our phenotypic analyses of circulating T cells showed that PAMVAC augmented CD4⁺ NTCs
370 while both effector and central memory T cell frequencies were unaffected. Of most interest
371 were the vaccine-related changes in follicular helper T cell (Tfh) populations. It is well-
372 established that efficient, sustained antibody responses require CD4⁺ helper T (Th) cells, and
373 in particular the Tfh subset^{20,21}. Tfh cells are essential for the generation of high-affinity
374 memory B cells through the germinal center (GC) reaction required for the complete
375 clearance of *Plasmodium* infection^{20,22}. Tfh cells also support the differentiation and survival

376 of GC B cells^{23,24}. At extrafollicular sites, these cells induce differentiation of B cells into
377 plasma cells that contribute to the early generation of specific antibodies after antigen re-
378 exposure²⁵. Here, we observed an increase in the CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺CXCR3⁻ Th2-polarized Tfh
379 subset, referred to as “superior B cell helpers” in vaccinees of the GLA-SE group. Our findings
380 are consistent with previous studies comparing adjuvants using *Mycobacterium tuberculosis*
381 antigen H56 in mice, and the malaria vaccine candidate P27A during a Phase Ib clinical trial
382 in Tanzania. In these studies, GLA-SE increased the frequency of circulating Tfh cells, with
383 transcriptional similarity and clonal relatedness to lymph node germinal center-Tfh cells, and
384 induced a greater extrafollicular antibody response compared to Alum^{26,27}. We observed
385 here in parallel a decrease in the Th2/Th1- Tfh subset ratio in the alhydrogel group on D84.
386 The Th1-type Tfh subset drives Th1-biased inflammatory cytokine responses rather than B
387 cell responses and has been associated with acute malaria attacks as well as with reduced
388 immunogenicity and efficacy of the RTS,S malaria vaccine^{28,29}. Our data thus suggest strongly
389 that the predominance of the “superior B cell helper” Tfh phenotype observed in the GLA-SE
390 group is reflected by the early and sustained enhancement of PAMVAC-specific memory B
391 cells revealed by ELISpot in that same group. The corresponding changes over time in the
392 frequencies of circulating B cell subsets - plasma cells and cMBC - in the GLA-SE group may
393 be related, similarly, to the preferential induction of Th2-type Tfh and have been described
394 previously^{27,30}.

395 Our study has some limitations that may have influenced the results. The small sample size
396 limited our ability to make meaningful comparisons between the groups. We were also
397 unable to provide absolute counts when analyzing sub-population of T and B cells in
398 phenotyping in which we analyzed total T and B cell rather than PAMVAC-specific T or B
399 cells. In addition, analyses performed in the current study did not take into account the
400 possible co-infections with bacteria or parasites that may have influenced the immune
401 responses to PAMVAC in the study population.

402 In conclusion, the data generated and presented here provide new insights into the quantity
403 and quality of cellular immune responses to the PAMVAC vaccine. We have identified
404 important adjuvant-related differences, in particular concerning Tfh profiles, that could

405 plausibly be said to be related to the memory B cell responses observed. Such findings will
406 be invaluable for the further development of both this and other vaccines.

407

408 Acknowledgements

409 We are extremely grateful to all the volunteers who participated in the study. We thank the
410 administrative staff of the University of Abomey-Calavi, the IRCB clinical trial platform staff
411 and IRD UMR 261 for the laboratory and the analyses contributions. We thank Louise Turner
412 for the gift of the CIDR1a antigen. We particularly thank Yannel Dossou, Jacqueline Affedjou,
413 Catherine Ahokponou, Aurax Fernando and all the field staff of PAMVAC in Abomey-Calavi
414 and Tubingen for their hard work during the follow-up. We thank Florentin Aussenac,
415 Jeremie Koffi, Jean-Claude Fan, Roseline Dasseya, Pepin Kounou for their laboratory
416 contributions. We also thank Parfait Hougbegnon for discussion during statistical analysis.

417

418 Funding

419 This study made use of biological samples and clinical data collected during the PAMVAC
420 Phase Ib clinical trial in Benin. PAMVAC constituted a part of the PlacMalVac project,
421 comprising a consortium of Danish, French, German and Beninese partners, that was funded
422 by the European Union Seventh Framework Programme (FP7-HEALTH-2012-INNOVATION,
423 under grant agreement 304815).

424 The work described here was supported by a PhD scholarship awarded to Tatiana
425 Hountohotegbe by the Islamic Development Bank.

426

427

428

429

430

431 References

- 432 1. Dellicour, S., Tatem, A. J., Guerra, C. A., Snow, R. W. & ter Kuile, F. O. Quantifying the
433 Number of Pregnancies at Risk of Malaria in 2007: A Demographic Study. *PLoS Med.* **7**,
434 e1000221 (2010).
- 435 2. Ayres Pereira, M. *et al.* Placental Sequestration of Plasmodium falciparum Malaria
436 Parasites Is Mediated by the Interaction Between VAR2CSA and Chondroitin Sulfate A on
437 Syndecan-1. *PLOS Pathog.* **12**, e1005831 (2016).
- 438 3. Whitty, C. J. M., Edmonds, S. & Mutabingwa, T. K. Malaria in pregnancy. *BJOG Int. J.*
439 *Obstet. Gynaecol.* **112**, 1189–1195 (2005).
- 440 4. Mayor, A. *et al.* How hidden can malaria be in pregnant women? Diagnosis by
441 microscopy, placental histology, polymerase chain reaction and detection of histidine-rich
442 protein 2 in plasma. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **54**, 1561–1568 (2012).
- 443 5. Castillo, P. *et al.* Massive Plasmodium falciparum visceral sequestration: a cause of
444 maternal death in Africa. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
445 **19**, 1035–1041 (2013).
- 446 6. Fitri, L. E. *et al.* Low Fetal Weight is Directly Caused by Sequestration of Parasites and
447 Indirectly by IL-17 and IL-10 Imbalance in the Placenta of Pregnant Mice with Malaria.
448 *Korean J. Parasitol.* **53**, 189–196 (2015).
- 449 7. Clausen, T. M. *et al.* Structural and functional insight into how the Plasmodium
450 falciparum VAR2CSA protein mediates binding to chondroitin sulfate A in placental malaria.
451 *J. Biol. Chem.* **287**, 23332–23345 (2012).
- 452 8. Tuikue Ndam, N. G. *et al.* High Level of var2csa Transcription by Plasmodium
453 falciparum Isolated from the Placenta. *J. Infect. Dis.* **192**, 331–335 (2005).
- 454 9. Salanti, A. *et al.* Evidence for the Involvement of VAR2CSA in Pregnancy-associated
455 Malaria. *J. Exp. Med.* **200**, 1197–1203 (2004).

- 456 10. Fried, M., Nosten, F., Brockman, A., Brabin, B. J. & Duffy, P. E. Maternal antibodies
457 block malaria. *Nature* **395**, 851–852 (1998).
- 458 11. Nielsen, M. A. *et al.* The Influence of Sub-Unit Composition and Expression System on
459 the Functional Antibody Response in the Development of a VAR2CSA Based Plasmodium
460 falciparum Placental Malaria Vaccine. *PloS One* **10**, e0135406 (2015).
- 461 12. Gbédandé, K. *et al.* Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria
462 vaccine PAMVAC: Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese
463 primigravidae. *Vaccine* **35**, 3474–3481 (2017).
- 464 13. Mordmüller, B. *et al.* First-in-human, Randomized, Double-blind Clinical Trial of
465 Differentially Adjuvanted PAMVAC, A Vaccine Candidate to Prevent Pregnancy-associated
466 Malaria. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **69**, 1509–1516 (2019).
- 467 14. Todryk, S. M. T Cell Memory to Vaccination. *Vaccines* **6**, (2018).
- 468 15. Gbédandé, K. *et al.* Infections with Plasmodium falciparum during pregnancy affect
469 VAR2CSA DBL-5 domain-specific T cell cytokine responses. *Malar. J.* **15**, 485 (2016).
- 470 16. Gupta, R. K., Rost, B. E., Relyveld, E. & Siber, G. R. Adjuvant properties of aluminum
471 and calcium compounds. *Pharm. Biotechnol.* **6**, 229–248 (1995).
- 472 17. Comoy, E. E., Capron, A. & Thyphronitis, G. In vivo induction of type 1 and 2 immune
473 responses against protein antigens. *Int. Immunol.* **9**, 523–531 (1997).
- 474 18. Gamain, B., Gratepanche, S., Miller, L. H. & Baruch, D. I. Molecular basis for the
475 dichotomy in Plasmodium falciparum adhesion to CD36 and chondroitin sulfate A. *Proc. Natl.*
476 *Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10020–10024 (2002).
- 477 19. Gamain, B., Smith, J. D., Miller, L. H. & Baruch, D. I. Modifications in the CD36 binding
478 domain of the Plasmodium falciparum variant antigen are responsible for the inability of
479 chondroitin sulfate A adherent parasites to bind CD36. *Blood* **97**, 3268–3274 (2001).

- 480 20. King, C., Tangye, S. G. & Mackay, C. R. T follicular helper (TFH) cells in normal and
481 dysregulated immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 741–766 (2008).
- 482 21. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
- 483 22. Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 429–
484 457 (2012).
- 485 23. Zotos, D. *et al.* IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation
486 through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* **207**, 365–378 (2010).
- 487 24. Linterman, M. A. *et al.* IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and
488 germinal center responses. *J. Exp. Med.* **207**, 353–363 (2010).
- 489 25. MacLennan, I. C. M. *et al.* Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* **194**, 8–18
490 (2003).
- 491 26. Hill, D. L. *et al.* The adjuvant GLA-SE promotes human Tfh cell expansion and
492 emergence of public TCR β clonotypes. *J. Exp. Med.* **216**, 1857–1873 (2019).
- 493 27. Olafsdottir, T. A. *et al.* Comparative Systems Analyses Reveal Molecular Signatures of
494 Clinically tested Vaccine Adjuvants. *Sci. Rep.* **6**, 39097 (2016).
- 495 28. Obeng-Adjei, N. *et al.* Circulating Th1 cell-type Tfh cells that exhibit impaired B cell
496 help are preferentially activated during acute malaria in children. *Cell Rep.* **13**, 425–439
497 (2015).
- 498 29. Bowyer, G. *et al.* CXCR3+ T Follicular Helper Cells Induced by Co-Administration of
499 RTS,S/AS01B and Viral-Vectored Vaccines Are Associated With Reduced Immunogenicity and
500 Efficacy Against Malaria. *Front. Immunol.* **9**, 1660 (2018).
- 501 30. Desbien, A. L. *et al.* IL-18 and Subcapsular Lymph Node Macrophages are Essential for
502 Enhanced B Cell Responses with TLR4 Agonist Adjuvants. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **197**,
503 4351–4359 (2016).

504

505 Tables

Table 1. Description of the study population

Characteristics	Alhydrogel (n=9)	Gla-SE (n=9)	Placebo (n=3)
Age in years *	19 (18 ; 21)	20 (18 ;24)	21 (20 ; 22)
Weight in Kg *	56 (51 ; 80)	50.75 (49 ;56)	54 (52 ; 97)
BMI in kg/m ² *	22.51 (19.20 ; 30.11)	20.10 (17.27 ; 24.56)	20.83 (20.57 ; 33.96)

* Median (min;max), n represents the number of individuals

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520 **Figure 1.** Study flow chart

521 **Figure 2.** Cytokine responses during the follow-up. Concentrations of cytokine in culture
522 supernatant of PBMC in response to stimulation with PAMVAC or PHA were quantified at
523 days -1, 56, 84 & 168. Box plots illustrate medians with 25th and 75th percentiles and
524 whiskers for 10th and 90th percentiles by group at each time-point. *p* values were determined
525 by the non-parametric Kruskal-Wallis test in univariate analyses. Data was considered as
526 significant if *p* value ≤ 0.05 .

527 **Figure 3.** Frequencies of IgG-secreting cells. ELISpot assay was used to measure the
528 frequencies of B cells secreting IgG of any specificity (total IgG), with specificity for either
529 PAMVAC, CIDR1a, or TT at day -1, 56, 84, 168. Curves illustrate means with SEM by antigen at
530 each time-point according to volunteer group. *p* values were determined by the non-
531 parametric Wilcoxon test. Bonferroni correction was applied and data was considered as
532 significant if *p*-value < 0.0125 . * *p* ≤ 0.0125 ; ** *p* ≤ 0.0025 .

533 **Figure 4.** CD4⁺ and CD8⁺ T cells phenotyping. Percentages of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells
534 were calculated as proportions of either total T or B cell. Median of the proportions was plot
535 to describe the kinetics of different subset during the follow-up. Curve illustrate means with
536 SEM Differences between each time point and day-1 were assessed with the non-parametric
537 Wilcoxon test. Bonferroni correction was applied due to multiple comparisons. *p* value $<$
538 0.0125 was regarded as significant. * *p* ≤ 0.0125 .

539 **Figure 5.** Change in T follicular helper cells subsets proportions after PAMVAC
540 administration.

541 A. Expression of CXCR5 and PD1 on CD4⁺CD45RA⁺ T cells during the follow-up.

542 B. Expression of CXCR3 on CD4⁺CD45RA⁺CXCR5⁺PD1⁺ T cells during the follow-up.

543 Median percentages of expression of either CXCR5 or PD1 were plot by group with 10th and
544 90th percentiles. Tfh PD1⁺ cells expressing CXCR3 or not (Tfh1 and Tfh2 subpopulations)
545 were presented as ratio (number of Tfh2/ number of Tfh1). Box plots illustrate medians with

546 25th and 75th percentiles and whiskers for 10th and 90th percentiles by group at each time-
547 point. *p* values were determined by the non-parametric Kruskal-Wallis test in univariate
548 analyses. Data was considered as significant if *p* value \leq 0.05.

549

550 **Figure 6.** PAMVAC augments frequencies of Plasma cells and classical memory B cells.

551 A. A) Plot illustrate Proportions of B cell subsets: Immature B cells CD10+, naïve B cells (NBC)
552 CD10-CD27-CD21+, atypical memory B cells (aMBC) CD10-CD27-CD21-, classical memory B
553 cells (cMBC) CD10-CD27+CD21+, Plasma cells/plasmablast/activated B cells CD10-
554 CD27+CD21-.

555 B. Variation of mature B cells: NBC CD10-CD27-CD21+, aMBC CD10-CD27-CD21-, cMBC
556 CD10-CD27+CD21+, activated B cells CD10-CD27+CD21- CD20+CD38, Plasma cells
557 /Plasmablast CD10-CD27+CD21- CD20-CD38+++.

558 Mean percentages with SEM of each subset were plot by group. Differences between each
559 time point and day-1 were assessed with the non-parametric Wilcoxon test. Bonferroni
560 correction was applied due to multiple comparisons. *p* value \leq 0.0125 was regarded as
561 significant. * *p* \leq 0.0125.

562

563

564

565

566

567

568

569

Figure 1

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

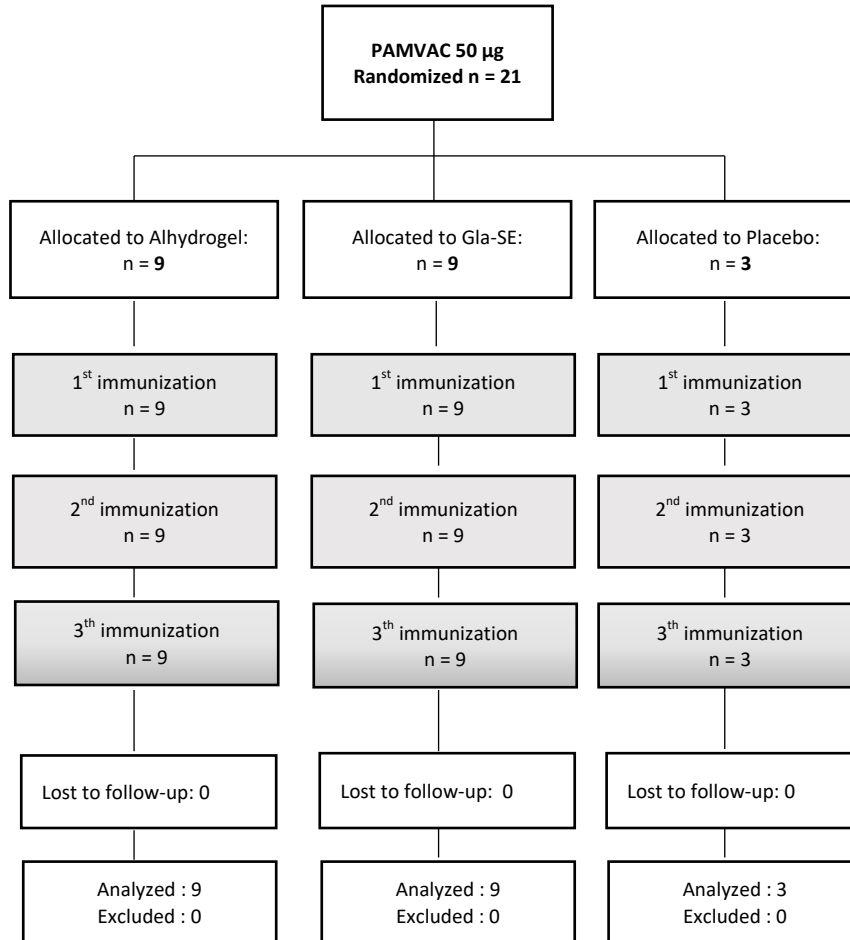
583

584

585

586

587



588

589 **Figure 2**

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

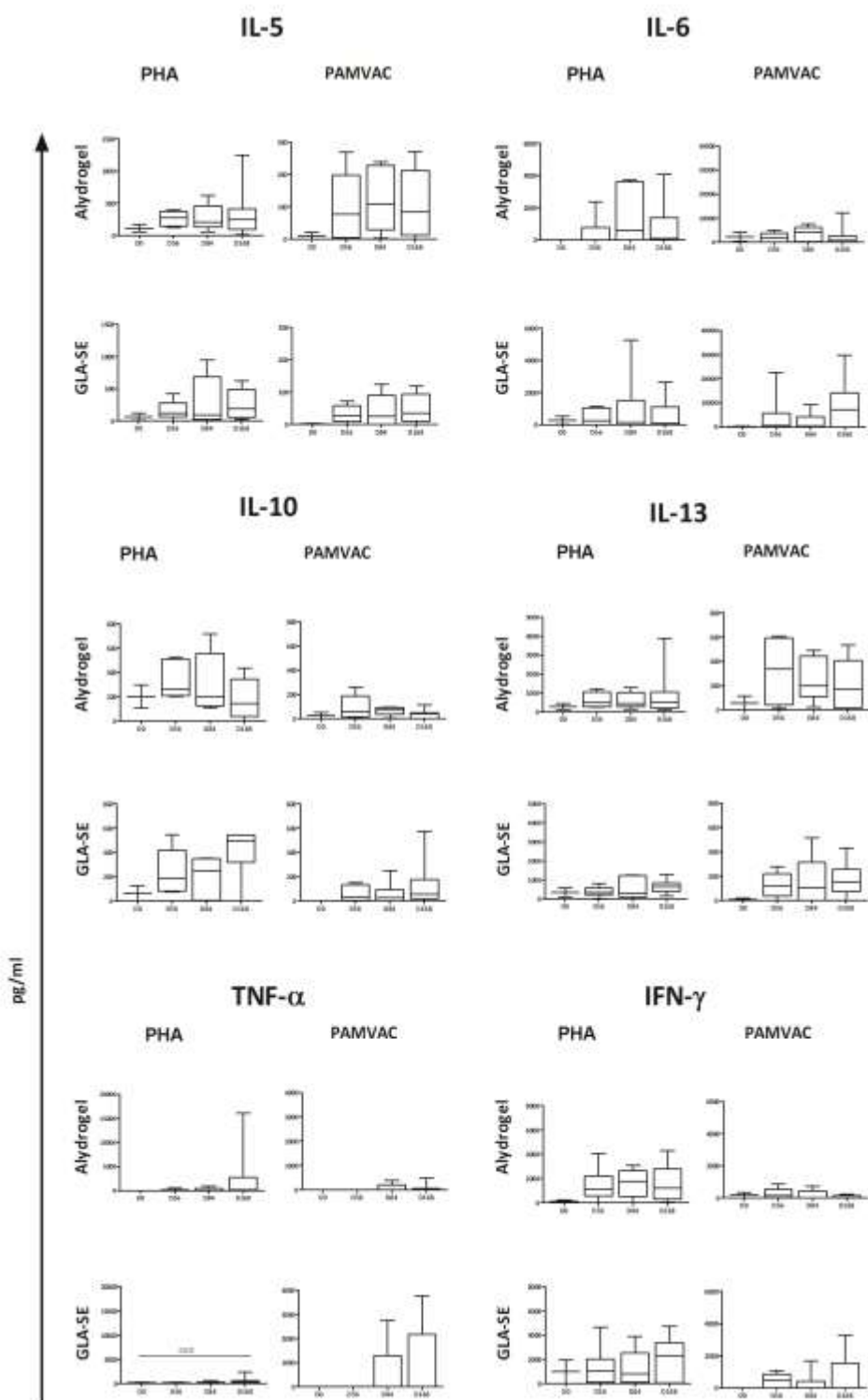
602

603

604

605

606



607

608 **Figure 3**

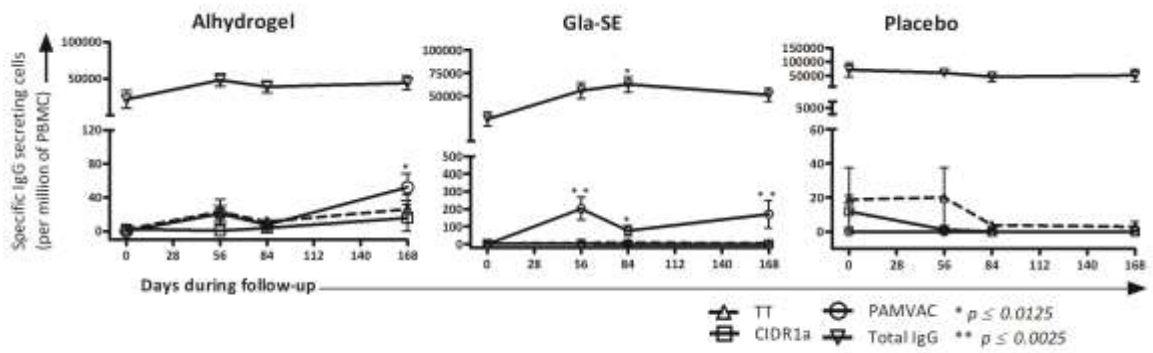
609

610

611

612

613



614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

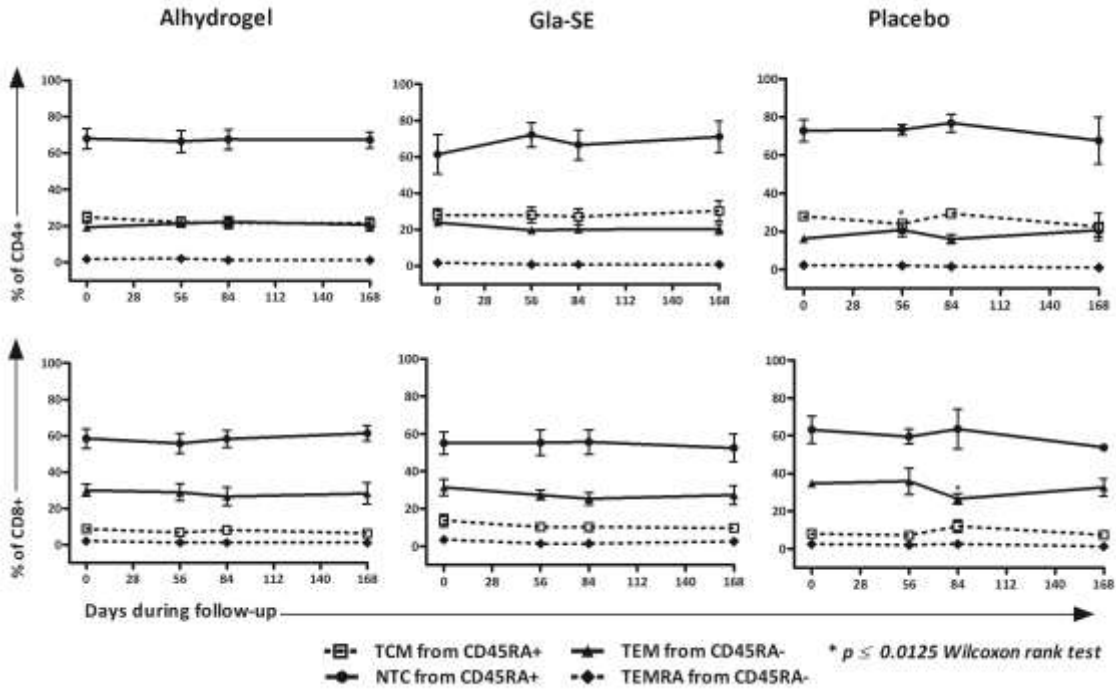
Figure 4

624

625

626

627



628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

Figure 5

641

A. Expression of CXCR5 and PD1

642

CXCR5+

PD1+

643

644

645

646

B. Expression of CXCR3

647

648

649

650

651

652

653

654

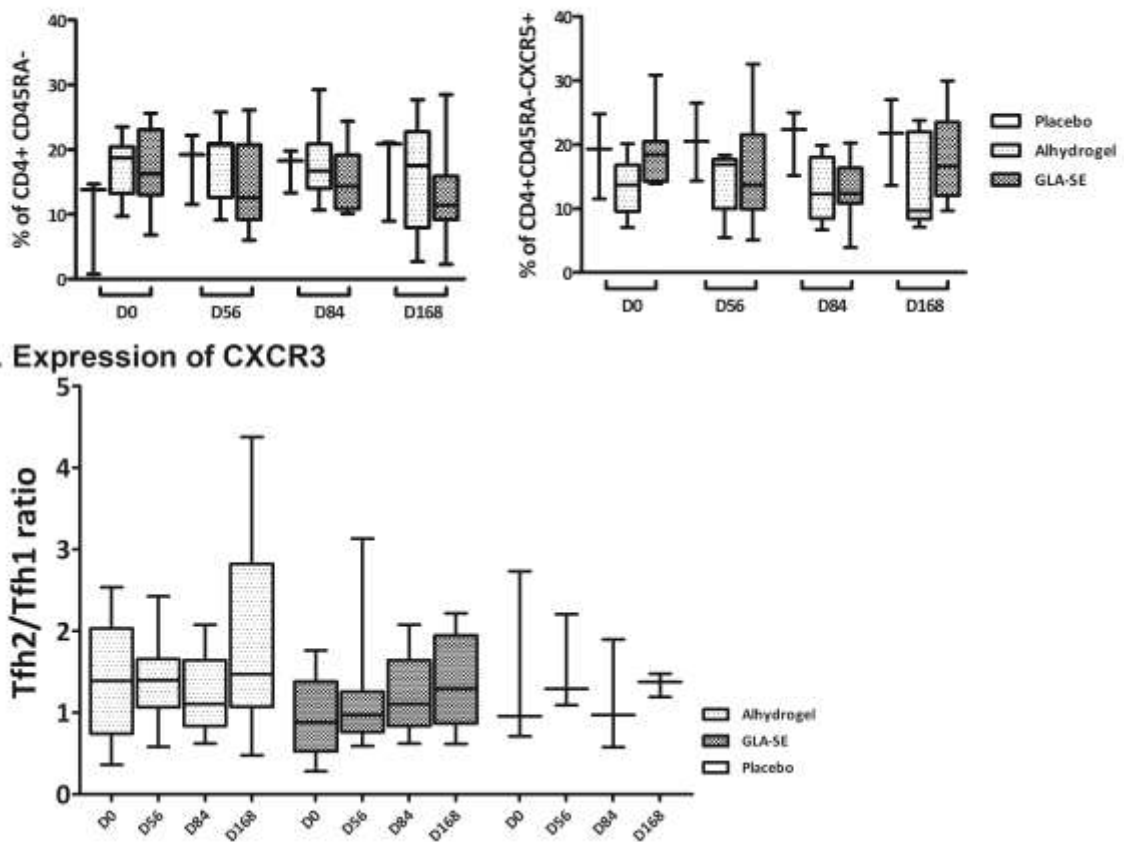
655

656

657

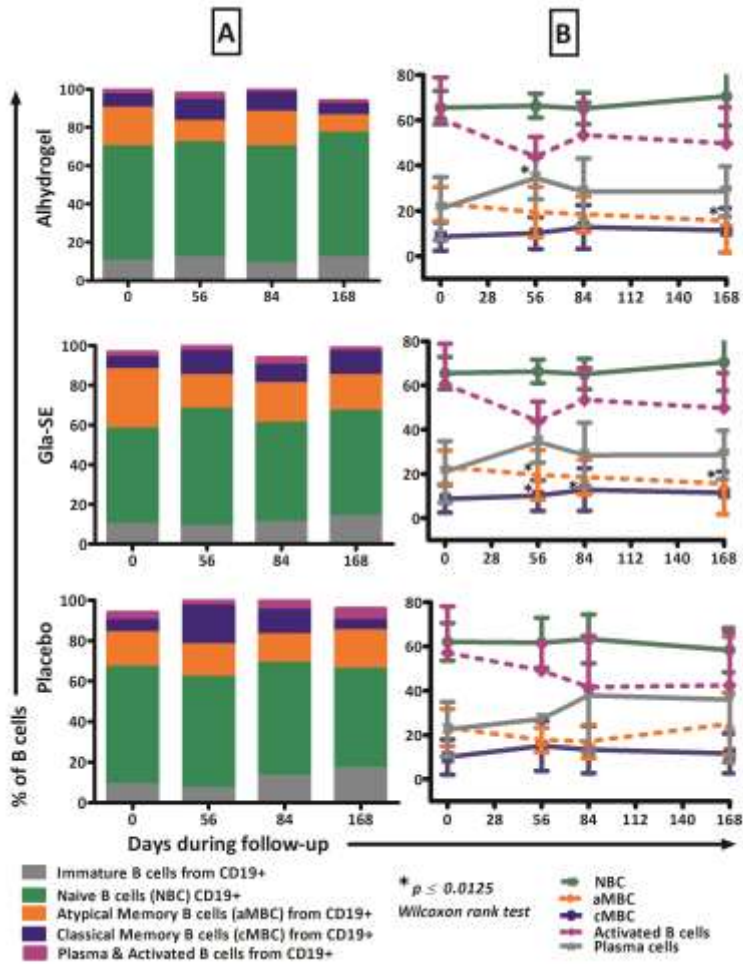
658

659



660

661 **Figure 6**



662

DISCUSSION GENERALE

Dans le cadre du développement clinique d'un vaccin contre le PAG, mon travail de thèse s'est intéressé à l'étude de l'immunogénicité du candidat vaccin PAMVAC. Tandis que la plupart des études d'immunogénicité des vaccins portent sur les réponses anticorps nous nous sommes concentrés sur les réponses immunitaires cellulaires.

En effet, nos travaux s'intègrent dans les objectifs exploratoires de l'essai clinique du vaccin PAMVAC. Il se subdivise en deux parties qui étudient :

- i) le profil des cytokines et leur intérêt pour le pronostic et le diagnostic de l'infection palustre et ses complications au cours de la grossesse et à l'accouchement ;
- ii) les réponses mémoires cellulaires T et B induites par le candidat vaccin PAMVAC chez des femmes nulligestes béninoises ;

La compréhension des mécanismes immunitaires dirigés contre le vaccin PAMVAC permettra d'améliorer son immunogénicité en vue de la poursuite de son développement en phase II.

Les cohortes des projets STOPPAM, PAMVAC et PlacMalVac nous ont permis de mener nos études. Ces cohortes sont originales du fait du suivi longitudinal effectué et de la qualité des données collectées ou disponibles pour chacune d'elles. Il s'agit de données cliniques, parasitologiques et anthropométriques. Concernant les projets STOPPAM et PlacMalVac, des données d'échographies obstétricales ayant permis l'évaluation de l'âge de la grossesse et de la croissance fœtale étaient disponibles au moment de notre étude. La détermination du profil des cytokines à partir des échantillons de la grande cohorte de STOPPAM était irréalisable à cause du coût onéreux des réactifs. Pour cela, nous avons constitué des groupes en fonction de l'histoire palustre et des complications survenues au cours de la grossesse. Nous avons voulu déterminer le profil des cytokines au début, en milieu de grossesse et à l'accouchement. Cependant, la plupart des femmes ont été incluses vers la 16^{ème} semaine d'aménorrhée. Pour cela, nous avons mesuré les taux de cytokines à l'inclusion, à la quatrième consultation prénatale et à l'accouchement pour éviter le chevauchement des mesures.

La cohorte de PAMVAC étant constituée pour un essai de phase I, nous avons travaillé sur une population de petite taille. Cependant, la particularité de cette cohorte réside dans la précision des données collectées. Concernant le projet PlacMalVac, nous avons souhaité mener notre étude sur l'ensemble de la cohorte mais la disponibilité des réactifs et du matériel biologique aux différents temps du suivi nous ont contraints à sélectionner un échantillon pour l'analyse des phénotypes.

En général, la petite taille des différents groupes étudiés constituait une insuffisance lors de nos analyses statistiques.

Au cours de nos travaux, nous avons eu recours à différentes approches méthodologiques. Dans la première partie, afin de déterminer le profil des cytokines au cours de la grossesse et à l'accouchement, nous avons manipulé des plasmas congelés à -80°C alors que dans la deuxième, nous avons travaillé sur des cellules congelées. Cela nous a permis de traiter les échantillons dans les mêmes conditions et au même moment. Ainsi pour l'étude du profil des cytokines au cours de la grossesse, nous avons quantifié les cytokines dans le sang périphérique grâce à la cytométrie en flux pour non seulement étudier leur intérêt pronostic mais également pour compléter les données qui existent à partir des études antérieures menées sur le sang placentaire. Nous avons ensuite interrogé les lymphocytes T mémoires par le dosage des cytokines dans le surnageant de culture des CMN en utilisant la cytométrie en flux tandis que les réponses B mémoires étaient évaluées grâce à la quantification des cellules sécrétrices d'anticorps par la technique de l'ELISpot. Cette dernière technique est l'une des méthodes quantitatives sensibles utilisées pour étudier les cellules B mémoires dans le contexte de la vaccination (336,337). Par la suite, nous avons également utilisé la cytométrie en flux pour l'analyse des phénotypes de cellules mémoires. Pour cela, en plus de la cohorte PAMVAC, nous avons sélectionné un sous échantillon du projet PlacMalVac afin d'avoir une vue d'ensemble sur les phénotypes aussi bien dans un contexte d'infection naturelle qu'après vaccination. Nous n'avons pas étudié les populations de lymphocytes T et B mémoires spécifiques du vaccin du fait de la quantité insuffisante de l'antigène vaccinale disponible pour le travail au moment de notre étude.

Notre thèse portant essentiellement sur l'étude des réponses immunitaires induites par le candidat vaccin PAMVAC, nous avons estimé qu'il est important de compléter premièrement les connaissances existantes sur les réponses immunitaires au cours du PAG. Dans ce contexte nous avons étudié le profil des cytokines au cours de la grossesse chez des femmes enceintes exposées à l'infection palustre. Les cytokines sont des médiateurs solubles permettant les interactions cellulaires. Elles coordonnent les réponses immunitaires et de nombreux processus tels que l'inflammation et l'hématopoïèse. Elles sont de ce fait impliquées dans la physiopathologie de nombreuses maladies et constituent une cible thérapeutique en plein développement. Leur dosage est aujourd'hui un outil de recherche notamment pour la collecte d'information utile pour le pronostic (338,339). Ainsi nous avons quantifié 5 cytokines, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70 et IFN- γ . Le choix de ces cytokines a été guidé par les

observations antérieures notamment celles émanant de notre équipe. En effet, de nombreuses études rapportent l'implication des cytokines inflammatoires dans la survenue des complications du paludisme placentaire (237,287,310,311,340). Notre équipe a montré particulièrement une association entre les faibles concentrations placentaires des cytokines IL-5 et IFN- γ et la survenue du faible poids de naissance (341). Cependant, la plupart des études sur le PAG portent sur le sang placentaire. Peu de données existent sur les infections au niveau du sang périphérique au cours de la grossesse. Le dosage des cytokines dans les échantillons de sang périphérique collectés au cours d'étude longitudinale permettront de mieux comprendre les phénomènes immunologiques précédant l'infection placentaire et l'intérêt de ces biomarqueurs pour le pronostic de l'évolution de la grossesse.

Nous avons ainsi analysé les taux de cytokines aux trois temps. A l'exception de l'IL-10 qui présentait des concentrations élevées, nous avons observé en général une diminution des autres cytokines particulièrement l'IL-5 et l'IL-12p70 au cours de la grossesse. L'effet immunosuppresseur de l'IL-10 sur les lymphocytes TCD4+ est bien connu au cours d'une infection (342–344). Il pourrait être à l'origine de la diminution des taux de cytokines aussi bien de type Th1 que Th2. La comparaison des taux de cytokines entre les 4 groupes de femmes constitués dans notre première étude n'a pas montré de différence statistiquement significative. Ceci pourrait être dû à la petite taille de nos sous échantillons. Au contraire, l'analyse des taux de cytokines en fonction du nombre d'infection survenue au cours de la grossesse a révélé des taux d'IL-10 plus élevés chez les femmes infectées en comparaison avec celles qui n'étaient pas infectées. Cependant, ces taux d'IL-10 diminuaient remarquablement lorsque le nombre d'infection augmente. En effet, les femmes infectées au cours du suivi étaient systématiquement traitées selon le protocole du projet STOPPAM. Ainsi, la présence d'un traitement médicamenteux empêcherait une réponse anti-inflammatoire de se mettre en place. Nos résultats sont en adéquation avec nos observations antérieures concernant l'association entre les niveaux de cytokines circulantes et la présence d'infections submicroscopiques (345).

Par la suite nous avons effectué des analyses multivariées pour mieux comprendre l'association entre les taux de cytokines mesurées et l'infection palustre d'une part et d'autre part entre ces taux de cytokines et les complications de la grossesse. Pour cela nous avons analysé premièrement l'effet concomitant de la présence d'infection palustre sur les taux de cytokines mesurées à chaque temps. Les concentrations d'IFN- γ étaient légèrement augmentées à l'inclusion et à l'accouchement tandis que les taux d'IL-10 étaient significativement élevés durant les 3 temps. Cependant, la concentration d'IL-10 à l'inclusion

était plus faible chez les multigestes que les primigestes. Les infections à l'inclusion sont considérées comme des infections chroniques. De plus, les femmes infectées par *P. falciparum* au cours des grossesses successives développent des anticorps et deviennent plus résistantes à l'infection (346,347). Une réponse IL-10 ne serait donc pas nécessaire pour contrôler les réponses inflammatoires nécessaires à l'élimination du parasite chez les femmes multigestes.

Nous avons ensuite analysé la valeur prédictive des niveaux de cytokines circulantes à l'inclusion en ce qui concerne la survenue de l'infection à *P. falciparum*. Les concentrations élevées d'IFN- γ à l'inclusion étaient associées à une réduction significative du risque d'infection par *P. falciparum* pendant la grossesse. En revanche, les niveaux élevés d'IL-12p70 étaient associés à l'augmentation du nombre d'épisodes d'infection à *P. falciparum* pendant la grossesse. Ces associations paraissent contradictoires pour deux cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'IL-12 est nécessaire pour une production optimale d'IFN- γ in vivo au cours des réponses immunitaires, en particulier lors d'infections bactériennes ou parasitaires (348). Les monocytes circulants sont la principale source d'IL-12p70 bioactive, en réponse à laquelle les cellules NK produisent facilement de l'IFN- γ , activant les macrophages et renforçant leur activité bactéricide. Ce mécanisme d'activation des macrophages est indépendant des cellules T au cours des premières phases de la résistance innée aux infections (349). Par ailleurs, la capacité de l'IL-12 à induire et à maintenir des réponses de type Th1 spécifiques de l'antigène est essentielle pour contrôler les infections par de nombreux pathogènes microbiens (150,348). Il semblerait que l'immunomodulation due à la grossesse d'une part et à l'infection à *P. falciparum* d'autre part influence les niveaux systémiques des cytokines en fonction de différents facteurs tels que l'âge gestationnel et la chronicité de l'infection. L'évolution de la grossesse est caractérisée par un changement de la balance Th1/Th2 avec une diminution des cytokines de type Th1 et une augmentation des cytokines de type Th2. Des concentrations élevées d'IL-10 en circulation devraient inhiber l'activation des monocytes et la synthèse de cytokines de type Th1. Remarquons que les faibles concentrations systémiques d'IL-12 face à des niveaux élevés d'IL-10 sont une caractéristique du paludisme grave décrite chez les enfants(350,351). De plus, la régulation à la baisse de l'IL-12p70, résultant d'une réduction de la transcription de son composant IL-12p40, est corrélée à l'absorption du pigment d'hémozoïne de *P. falciparum* et à des niveaux élevés d'IL-10 chez les enfants atteints d'anémie palustre sévère (352). Cependant, l'implication de ces mécanismes dans les réponses aux infections non compliquées associées à la grossesse reste inconnue. Par ailleurs, il convient de noter que nous n'avons pas trouvé d'association entre les concentrations d'IL-10 à l'inclusion et la présence ou le nombre d'épisodes d'infection à *P. falciparum* pendant la grossesse.

De l'analyse prospective de l'influence des infections survenues au cours de la grossesse sur les taux de cytokine à l'accouchement, il ressort uniquement une association avec les taux d'IL-10. Les femmes qui ont eu au moins une infection à *P. falciparum* pendant la grossesse avaient un taux d'IL-10 significativement plus élevé à l'accouchement que celles qui n'avaient pas eu d'infection pendant la grossesse. En plus de la prise systématique d'un traitement préventif intermittent à base de sulfadoxine-pyriméthamine à partir du deuxième trimestre de la grossesse, les femmes infectées étaient traitées. Les infections détectées à l'accouchement étaient considérées comme des infections récentes nécessitant une réponse inflammatoire de type Th1. Les taux d'IL-10 élevés observés ici pourraient être associés à la mise en place d'un mécanisme de régulation pour préserver le fœtus.

La première partie de nos travaux s'est achevée par l'analyse multivariée de l'association entre les taux de cytokines mesurées au cours de la grossesse et la survenue de la PTB ou de SGA indépendamment de l'infection à *P. falciparum* et de l'anémie. Ainsi, l'augmentation du risque de PTB était associée aux concentrations élevées de l'IL-12p70 à l'inclusion tandis que la même association a également été trouvée pour l'augmentation des concentrations de l'IL-5 et l'IL-10 à CPN4. A l'opposé, l'augmentation des concentrations de l'IL-12p70 et d'IL-4 à CPN4 et de l'IL-5 à l'accouchement étaient associées à un risque significativement réduit de PTB. De nombreuses études ont rapporté que les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-12, sont impliquées dans la pathogenèse des complications de la grossesse (353–355). Cependant, dans la plupart de ces études les taux de cytokine ont été mesurés à l'accouchement. Au cours de l'étude longitudinale STOPPAM, les femmes ont reçu 2 doses espacées d'au moins 1 mois d'intervalle de l'association sulfadoxine-pyriméthamine, entre l'inclusion et CPN4. Ainsi, il est possible que chez les femmes porteuses d'une infection à *P. falciparum* au moment du traitement, la clairance des parasites pendant cet intervalle ait conduit à un changement dans le profil des cytokines circulantes, ce qui pourrait expliquer les associations contrastées observées à deux moments différents pendant la période de traitement.

Par ailleurs, nous avons constaté que l'augmentation du risque de naissance d'un bébé SGA était associée à des concentrations élevées d'IL-5 à l'inclusion. En revanche, les concentrations élevées de la même cytokine mesurée à l'accouchement étaient associées à une réduction significative du risque d'avoir un bébé SGA, l'inverse étant clairement que de faibles niveaux d'IL-5 étaient associés à une augmentation de ce risque. Ce résultat confirme les observations de nos collaborateurs, à savoir que de faibles niveaux d'IL-5 dans le plasma placentaire correspondaient à un risque accru d'avoir un bébé SGA (341). Dans cette étude, il a également été observé la même association avec un risque accru d'avoir un bébé SGA pour

les faibles taux d'IFN- γ placentaire. Cependant, nous n'avons pas fait cette observation pour les concentrations d'IFN- γ du sang périphérique mesurées ici. Néanmoins, il est frappant que les concentrations de la même cytokine, l'IL-5, mesurées à l'accouchement semblent ici distinguer deux groupes dont l'issue de la grossesse est très différente, c'est-à-dire que celles qui présentaient de faibles concentrations d'IL-5 au moment de l'accouchement avaient un risque plus élevé de PTB ou de SGA. La question de savoir si l'activité immunosuppressive de l'IL-10 induite par l'infection joue un rôle déterminant dans ce scénario et comment précisément la suppression d'une cytokine de type Th2 pourrait être mécaniquement liée à l'une ou l'autre complication de la grossesse sont des questions qui restent à élucider.

Dans la deuxième partie de notre thèse, nous avons décrit les réponses mémoires cellulaires induites par la vaccination chez des volontaires vivant en zone d'endémie palustre au cours du premier essai de phase Ib chez l'homme d'un vaccin placentaire contre le paludisme. L'objectif principal de l'étude PAMVAC était de déterminer l'innocuité du candidat vaccin. L'un des objectifs exploratoires était l'évaluation des réponses cellulaires T et B spécifiques du vaccin pour compléter la détermination des réponses humorales induites.

La quantification des réponses des lymphocytes T mémoires pendant et après la vaccination est une étape nécessaire pour établir l'immunogénicité d'un vaccin (356). Les facteurs importants lors de la mesure de ces réponses sont les méthodes employées, le moment et le type d'échantillon. Les réponses lymphocytaires T mesurées dans des échantillons de sang périphérique au cours d'un essai vaccinal ont tendance à suivre le schéma typique d'une réponse immunitaire adaptative. Pour cela, nous avons quantifié les cytokines produites par les lymphocytes T mémoires spécifiques de PAMVAC dans les surnageants de culture des CMN stimulées. Les réponses T induites par une stimulation avec un mitogène la PHA ont été également mesurées et utilisées pour une meilleure interprétation des résultats. Ainsi, nous avons observé des tendances vers des concentrations élevées de cytokines de type Th1 et Th2 en réponse d'une part à la stimulation non spécifique par un mitogène et d'autre part par l'antigène vaccinal. Les résultats des travaux menés antérieurement par nos collaborateurs ont montré une association entre les niveaux élevés des cytokines de type Th1 et la présence d'infection au cours de la grossesse en réponse à la stimulation spécifique avec le domaine DBL5 de VAR2CSA(329). Des concentrations élevées de cytokines de type Th2 induites par des mitogènes ont également été signalées au cours de la grossesse et à l'accouchement dans une cohorte de femmes primigestes naturellement exposées à l'infection par *P. falciparum* (329,357). En outre, les concentrations de cytokines de type Th1 et Th2 que nous avons mesurées après stimulation avec l'antigène PAMVAC semblaient plus élevées que celles

observées chez les femmes primigestes (329). Cependant, nous avons remarqué que l'amplitude de la réponse était fonction selon l'adjuvant utilisé dans la formulation du vaccin. Ainsi, les concentrations d'IL-5 et d'IL-13 étaient plus élevées dans le groupe PAMVAC-Alhydrogel. L'Alhydrogel est un gel d'hydroxyde d'aluminium largement utilisé depuis plus de 80 ans comme adjuvant dans les vaccins homologués pour une utilisation chez l'homme (358). Les adjuvants à base d'aluminium sont capables d'augmenter les réponses de type Th2 avec de faibles réponses immunitaires à médiation cellulaire (359). Bien que nous n'ayons pas comparé les réponses entre les adjuvants à l'aide de méthodes statistiques, l'amplitude des concentrations des cytokines de type Th2 semblait plus élevée après l'immunisation avec PAMVAC-Alhydrogel qu'avec GLA-SE.

Nous avons ensuite étudié les réponses lymphocytaires B mémoires à l'aide de tests ELISpot. Après induction de la prolifération et de la différenciation des CMN congelées lors de l'étude PAMVAC, la fréquence des cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal a été déterminée. D'autres antigènes ont été également utilisés. Il s'agit de CIDR1, TT et un anti-IgG totale. Nos résultats ont montré que la vaccination avec PAMVAC induit des réponses des lymphocytes B mémoires qui augmentaient de façon notable après la deuxième dose de vaccin et qui persistaient dans le temps à des niveaux équivalents ou nettement supérieurs à ceux que nous avons mesuré précédemment chez des primigestes béninoises (≈ 20 spots/million de CMN) (329). Il convient de noter que la fréquence post-vaccinale des cellules B sécrétant des IgG spécifiques de l'antigène vaccinal a augmenté rapidement de J0 à J56 dans le groupe ayant reçu le vaccin avec l'adjuvant GLA-SE, atteignant un pic à la fois soutenu et nettement plus élevé que celui des personnes ayant reçu le vaccin avec l'Alhydrogel. Nos résultats sont cohérents avec les taux plasmatiques élevés d'IgG spécifiques de l'antigène vaccinal mesurés quatre semaines après la dernière vaccination de volontaires allemands naïfs ayant reçu le vaccin PAMVAC avec GLA-SE (360). Des analyses sont en cours pour déterminer si les anticorps spécifiques induits par la vaccination présentent une activité fonctionnelle différente en fonction de l'adjuvant utilisé.

Par ailleurs, la vaccination avec PAMVAC n'a pas significativement modifié les réponses des lymphocytes B aux autres antigènes. L'anatoxine tétanique (TT) a été utilisée comme témoin car elle est administrée systématiquement aux femmes enceintes dans le cadre du programme des soins de santé primaires. Ainsi, les fréquences des cellules sécrétrices d'IgG spécifiques de l'anatoxine tétanique n'ont pas changé de manière significative dans les groupes de femmes vaccinées. L'objectif du développement d'un vaccin contre le PAG étant de l'administrer aux jeunes filles avant leur première grossesse, il est important d'évaluer l'effet

potentiel du vaccin PAMVAC sur les réponses aux vaccins administrés pendant la grossesse. De même, les réponses des lymphocytes B à l'antigène CIDR1, un antigène non associé au PAG mais que nous avons inclus comme contrôle, étaient également inchangées chez les femmes vaccinées. L'antigène CIDR1 joue un rôle dans la cytoadhérence aux récepteurs endothéliaux au cours des infections palustres survenant en dehors de la grossesse. De ce fait, il n'intervient pas au cours du PAG (361,362). Il est important de noter que les réponses des lymphocytes B mémoires spécifiques de PAMVAC étaient indétectables pendant toute la durée de l'étude dans le groupe placebo et avant la vaccination dans les deux autres groupes. Nos résultats pourront être confirmés par la quantification des anticorps dans le plasma des mêmes volontaires.

Nous avons enfin analysé les phénotypes des cellules T et B mémoires circulantes au cours de l'étude PAMVAC. Pour cela, grâce à la cytométrie en flux nous avons déterminé la fréquence de ces cellules à partir de CMN congelées dans l'azote liquide au cours de l'étude PAMVAC. Nos résultats montrent que le vaccin PAMVAC induisait une augmentation de la fréquence de cellules CD4⁺ NTC, alors que la fréquence des cellules T mémoires effectrices et centrales n'était pas affectée. Cependant, les modifications observées dans les populations Tfh sont particulièrement intéressantes. Il est bien établi que les réponses anticorps efficaces et durables nécessitent l'implication de cellules Th, en particulier la sous population Tfh (320,363). Les cellules Tfh jouent un rôle important dans la génération de cellules B mémoires de haute affinité lors de la réaction du centre germinatif (CG) pour une clairance complète de l'infection par le *Plasmodium* (202,364). Les cellules Tfh favorisent également la différenciation et la survie des cellules B du CG (365,366). Dans les sites extrafolliculaires, ces cellules induisent la différenciation des cellules B en plasmocytes qui contribuent à la génération précoce d'anticorps spécifiques après une réexposition à l'antigène (367). Au cours de notre étude, nous avons observé une augmentation de Tfh polarisé de type Th2 de phénotype CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺CXCR3⁻, appelé " superior B cell helper " chez les vaccinés du groupe GLA-SE. Nos résultats sont cohérents avec les études précédentes comparant les adjuvants en utilisant l'antigène H56 de *Mycobacterium tuberculosis* chez la souris, et le candidat vaccin contre le paludisme P27A lors d'un essai clinique de phase Ib en Tanzanie (368). Dans cette étude, l'adjuvant GLA-SE induisait une augmentation de la fréquence des cellules Tfh circulantes et une réponse anticorps extrafolliculaire plus importante que l'Alum (368). Les Tfh circulant présentent une similarité transcriptionnelle et une parenté clonale avec les cellules Tfh des centres germinatifs des ganglions lymphatiques (368,369). En parallèle, nous avons

observé dans notre étude, une diminution du ratio Tfh type-Th2/type-Th1 dans le groupe alhydrogel à J84. Les cellules Tfh de type Th1 dirigent les réponses inflammatoires de type Th1 plutôt que les réponses cellulaires B. Elles ont été associées aux épisodes aigus de paludisme ainsi qu'à la diminution de l'immunogénicité et de l'efficacité du vaccin RTS,S (370,371). Nos résultats suggèrent que la prédominance de Tfh de type "Superior B cell helper" observée dans le groupe GLA-SE est traduite par l'augmentation précoce et durable des cellules B mémoires spécifiques de PAMVAC révélée par ELISpot dans ce même groupe. Les modifications observées ultérieurement dans les fréquences des sous-populations de lymphocytes B circulants (plasmocytes et cMBC) dans le groupe GLA-SE peuvent être liées, de la même manière, à l'induction préférentielle de Tfh de type Th2 et ont été décrits précédemment (368,372).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nos travaux de thèse ont contribué d'une part à approfondir les connaissances sur l'évolution de l'immunité au cours de la grossesse dans un contexte d'exposition à l'infection palustre. Le paludisme associé à la grossesse entraîne une modification des mécanismes de défense de la mère à l'origine de graves conséquences pour elle et le fœtus. De nombreuses études ont montré l'implication des acteurs de l'immunité dans la survenue de ces conséquences. Cependant, la plupart de ces études se limitent aux infections placentaires et ne permettent pas de comprendre les mécanismes associés à l'histoire de ce phénomène. De plus, l'identification de paramètres immunologiques caractéristiques de l'évolution d'une grossesse exposée à l'infection palustre permettra d'améliorer le pronostic vital des mères et de leur fœtus. Dans ce contexte nos résultats ont montré l'intérêt de l'utilisation des cytokines comme marqueurs diagnostic ou pronostic du paludisme associé à la grossesse et de ses complications.

D'autre part, nos travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes des réponses immunitaires mises en place suite à la vaccination avec le candidat vaccin PAMVAC. Parmi les stratégies mises en place pour lutter contre le paludisme, la vaccination constitue un moyen qui fait face à de nombreux défis malgré le large éventail de candidats vaccins. Un vaccin contre le PAG permettra non seulement de protéger les mères mais également de préserver la santé des enfants à naître durant leurs premières années de vie. Nous avons montré que le candidat vaccin PAMVAC induit des réponses T mémoires dont l'amplitude varie en fonction de l'adjuvant utilisé pour sa formulation. Ces résultats sont importants pour la prise de décision dans la poursuite des essais en Phase II pour les études d'efficacité et de sécurité du vaccin PAMVAC. Cependant, l'efficacité d'un tel vaccin réside dans sa capacité à induire des anticorps fonctionnels capables d'inhiber les interactions des GRi au niveau du placenta et de favoriser leur élimination. Pour cela nous avons évalué la fonctionnalité des anticorps induits après la vaccination avec PAMVAC sur la cohorte de femmes nulligestes béninoises et une cohorte de volontaires naïfs allemands. Nos résultats préliminaires suggèrent que PAMVAC induit des anticorps capables de reconnaître les GRi et de médier leur phagocytose. Nous envisageons de poursuivre les études de fonctionnalité avec des tests autres que la phagocytose et de l'étendre aux cellules B mémoires afin de mieux comprendre les mécanismes de protection induits par le vaccin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Paludisme [Internet]. [cité 2 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
2. World malaria report 2019 [Internet]. [cité 7 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>
3. World Malaria Report 2020 [Internet]. [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020>
4. Fried M, Duffy PE. Maternal malaria and parasite adhesion. *J Mol Med*. 26 févr 1998;76(3-4):162-71.
5. Weinberg ED. Pregnancy-Associated Depression of Cell-Mediated Immunity. *Rev Infect Dis*. 1 nov 1984;6(6):814-31.
6. Poovassery J, Moore JM. Murine malaria infection induces fetal loss associated with accumulation of *Plasmodium chabaudi* AS-infected erythrocytes in the placenta. *Infect Immun*. mai 2006;74(5):2839-48.
7. Stevens GA, Finucane MM, De-Regil LM, Paciorek CJ, Flaxman SR, Branca F, et al. Global, regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe anaemia in children and pregnant and non-pregnant women for 1995-2011: a systematic analysis of population-representative data. *Lancet Glob Health*. juill 2013;1(1):e16-25.
8. Guyatt HL, Snow RW. The epidemiology and burden of *Plasmodium falciparum*-related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg*. févr 2001;64(1-2 Suppl):36-44.
9. Eijk AM van, Larsen DA, Kayentao K, Koshy G, Slaughter DEC, Roper C, et al. Effect of *Plasmodium falciparum* sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the effectiveness of intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 1 mai 2019;19(5):546-56.

10. Malaria Threat Map [Internet]. [cité 2 juill 2020]. Disponible sur: <https://apps.who.int/malaria/maps/threats/>
11. Emerging Infectious Diseases of the 21st Century [Internet]. [cité 19 mai 2020]. Disponible sur: <http://www.springer.com/series/5903>
12. Daneshvar C, Davis TME, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PCS, et al. Clinical and Laboratory Features of Human *Plasmodium knowlesi* Infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 sept 2009;49(6):852-60.
13. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology [Internet]. 2019 [cité 18 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
14. Valecha N, Bhatia S, Mehta S, Biswas S, Dash AP. Congenital malaria with atypical presentation: A case report from low transmission area in India. Malar J. déc 2007;6(1):43.
15. Lesko CR, Arguin PM, Newman RD. Congenital Malaria in the United States: A Review of Cases From 1966 to 2005. Arch Pediatr Adolesc Med. 1 nov 2007;161(11):1062-7.
16. Ekanem AD, Anah MU, Udo JJ. The prevalence of congenital malaria among neonates with suspected sepsis in Calabar, Nigeria: Trop Doct [Internet]. 1 avr 2008 [cité 19 mai 2020]; Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1258/td.2007.005274>
17. Gitau GM, Eldred JM. Malaria in pregnancy: clinical, therapeutic and prophylactic considerations. Obstet Gynaecol. 2005;7(1):5-11.
18. Chauhan V, Negi R, Verma B, Thakur S. Transfusion Transmitted Malaria in a Non-Endemic Area. :2.
19. Transmission of Malaria [Internet]. Malaria Site. 2015 [cité 19 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.malariasite.com/transmission/>
20. Terminologie OMS du paludisme. :42.

21. Module de formation à la lutte contre le paludisme: prise en charge du paludisme. Guide du participant. :156.
22. Vythilingam I, NoorAzian YM, Huat TC, Jiram AI, Yusri YM, Azahari AH, et al. *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. Parasit Vectors. 19 août 2008;1:26.
23. Fradin MS. Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide. Ann Intern Med. 1 juin 1998;128(11):931.
24. JHSPH OCW [Internet]. [cité 22 mai 2020]. Disponible sur: <http://ocw.jhsph.edu/index.cfm/go/imageLib:il.viewImageDetails/resourceID/438DCC50-FFE9-0B64-8515BF619797AA48/browseTopic/Malaria/topicID/16/>
25. Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. Nature. oct 2002;419(6906):520-6.
26. Vaughan AM, Aly ASI, Kappe SHI. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: Gliding and Hiding. Cell Host Microbe. 11 sept 2008;4(3):209-18.
27. Silvie O, Mota MM, Matuschewski K, Prudêncio M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. Curr Opin Microbiol. août 2008;11(4):352-9.
28. Good MF, Doolan DL. Malaria's journey through the lymph node. Nat Med. sept 2007;13(9):1023-4.
29. Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger T-W, et al. A Conserved Molecular Motor Drives Cell Invasion and Gliding Motility across Malaria Life Cycle Stages and Other Apicomplexan Parasites. J Biol Chem. 24 févr 2006;281(8):5197-208.
30. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. Nat Med. févr 2006;12(2):220-4.

31. Singh AP, Buscaglia CA, Wang Q, Levay A, Nussenzweig DR, Walker JR, et al. *Plasmodium* Circumsporozoite Protein Promotes the Development of the Liver Stages of the Parasite. *Cell*. 2 nov 2007;131(3):492-504.
32. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 24 févr 2006;124(4):755-66.
33. Bosch J, Buscaglia CA, Krumm B, Ingason BP, Lucas R, Roach C, et al. Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci*. 24 avr 2007;104(17):7015-20.
34. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*. 1 avr 2008;118(4):1266-76.
35. Pukrittayakamee S, Imwong M, Singhasivanon P, Stepniewska K, Day NJ, White NJ. Effects of Different Antimalarial Drugs on Gametocyte Carriage in *P. Vivax* Malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1 sept 2008;79(3):378-84.
36. Ferguson HM, Read AF. Mosquito appetite for blood is stimulated by *Plasmodium chabaudi* infections in themselves and their vertebrate hosts. *Malar J*. 2004;8.
37. Malaria: Biology and Disease: Cell [Internet]. [cité 3 juill 2020]. Disponible sur: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(16\)31008-](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(16)31008-)
38. Chakravorty SJ, Hughes KR, Craig AG. Host response to cytoadherence in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Soc Trans*. 1 avr 2008;36(2):221-8.
39. Hirako IC, Assis PA, Hojo-Souza NS, Reed G, Nakaya H, Golenbock DT, et al. Daily Rhythms of TNF α Expression and Food Intake Regulate Synchrony of *Plasmodium* Stages with the Host Circadian Cycle. *Cell Host Microbe*. 13 juin 2018;23(6):796-808.e6.

40. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J.* déc 2006;5(1):85.
41. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci.* 6 févr 2007;104(6):1919-24.
42. Hemozoin (Malarial Pigment) Directly Promotes Apoptosis of Erythroid Precursors [Internet]. [cité 26 mai 2020]. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008446>
43. JaypeeDigital | Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* [Internet]. [cité 1 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.jaypeedigital.com/book/9789351523079/chapter/ch3>
44. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* févr 2002;415(6872):673-9.
45. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* sept 2005;5(9):722-35.
46. Molecular Aspects of Severe Malaria | Clinical Microbiology Reviews [Internet]. [cité 26 mai 2020]. Disponible sur: <https://cmr-asm-org.sirius.parisdescartes.fr/content/13/3/439>
47. Ho M, White NJ. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 1 juin 1999;276(6):C1231-42.
48. Masson E. Cerebral malaria: What is known and what is on research [Internet]. EM-Consulte. [cité 1 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/702051/alertePM>
49. Maier AG, Rug M, O'Neill MT, Brown M, Chakravorty S, Szeszak T, et al. Exported Proteins Required for Virulence and Rigidity of *Plasmodium falciparum*-Infected Human Erythrocytes. *Cell.* 11 juill 2008;134(1):48-61.

50. Mackintosh CL, Beeson JG, Marsh K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol.* déc 2004;20(12):597-603.
51. Horata N, Kalambaheti T, Craig A, Khusmith S. Sequence variation of PfEMP1-DBL α in association with rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates causing severe and uncomplicated malaria. *Malar J.* 2009;8(1):184.
52. Cockburn IA, Mackinnon MJ, O'Donnell A, Allen SJ, Moulds JM, Baisor M, et al. A human complement receptor 1 polymorphism that reduces *Plasmodium falciparum* rosetting confers protection against severe malaria. *Proc Natl Acad Sci.* 6 janv 2004;101(1):272-7.
53. Lalchhandama K. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *WikiJournal Med.* 2017;4(1).
54. Fried M, Duffy PE. Malaria during Pregnancy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6 janv 2017;7(6):a025551.
55. Mangano VD, Kabore Y, Bougouma EC, Verra F, Sepulveda N, Bisseye C, et al. Novel Insights Into the Protective Role of Hemoglobin S and C Against *Plasmodium falciparum* Parasitemia. *J Infect Dis.* 15 août 2015;212(4):626-34.
56. Mbanefo EC, Ahmed AM, Titouna A, Elmaraezy A, Trang NTH, Phuoc Long N, et al. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep [Internet].* 6 avr 2017 [cité 9 juill 2020];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5382680/>
57. Kuesap J, Chaijaroenkul W, Rungsahirunrat K, Pongjantharasatien K, Na-Bangchang K. Coexistence of Malaria and Thalassemia in Malaria Endemic Areas of Thailand. *Korean J Parasitol.* juin 2015;53(3):265-70.
58. Rowe JA, Handel IG, Thera MA, Deans A-M, Lyke KE, Koné A, et al. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci.* 30 oct 2007;104(44):17471-6.

59. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, et al. Malaria and the Red Cell. *Hematology*. 1 janv 2002;2002(1):35-57.
60. Mayer DCG, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, et al. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proc Natl Acad Sci*. 31 mars 2009;106(13):5348-52.
61. WHO | Guidelines for the treatment of malaria. Third edition [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 27 mai 2020]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>
62. Grobusch MP, Kremsner PG. Uncomplicated Malaria. *Malar Drugs Dis Post-Genomic Biol*. 2005;81-104.
63. Bartoloni A, Zammarchi L. CLINICAL ASPECTS OF UNCOMPLICATED AND SEVERE MALARIA. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 4 mai 2012;4(1):e2012026.
64. Chidiac C, Decazes J-M, Dubreuil L, Leport C, Lina B, Perronne C, et al. SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE DE LANGUE FRANÇAISE (SPILF) President: Jean-Paul STAHL Maladies infectieuses et tropicales, CHU de Grenoble - BP 217, 38043 Grenoble Cedex Tél : 04 76 76 52 91 - Fax : 04 76 76 55 69. :24.
65. Severe Malaria. *Trop Med Int Health*. sept 2014;19:7-131.
66. Sci-Hub | Severe falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94, 1–90 | 10.1016/S0035-9203(00)90300-6 [Internet]. [cité 4 juin 2020]. Disponible sur: [https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90300-6](https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90300-6)
67. Idro R, Jenkins NE, Newton CR. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol*. déc 2005;4(12):827-40.

68. Gangneux JP, Vignes S, Poinsignon Y, Derouin F. [Evolutive visceral malaria and hyperimmune palustral splenomegaly: a difficult distinction]. *Bull Soc Pathol Exot* 1990. févr 1999;92(1):27-8.
69. Maazoun F, Deschamps O, Barros-Kogel E, Ngwem E, Fauchet N, Buffet P, et al. Splénomégalie palustre hyper-réactive. </data/revues/02488663/v36i11/S0248866315005226/> [Internet]. 27 oct 2015 [cité 4 juin 2020]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/1010966>
70. Durieux M-F. Diagnostic biologique du paludisme. *Actual Pharm.* mars 2018;57(574):25-9.
71. Cours [Internet]. [cité 1 juill 2020]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/4.html>
72. Berry A, Iriart X, Magnaval J-F. Nouvelles méthodes de diagnostic du paludisme. *Rev Francoph Lab.* nov 2009;2009(416):65-70.
73. Moody A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev.* 1 janv 2002;15(1):66-78.
74. Véronique D. Haute Autorité de santé. 2016;104.
75. Howard RJ, Uni S, Aikawa M, Aley SB, Leech JH, Lew AM, et al. Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Cell Biol.* 1 oct 1986;103(4):1269-77.
76. Houzé S, Paris L. Apport des tests de diagnostic rapide en parasitologie: intérêt et limites. </data/revues/1773035X/v2015i474/S1773035X15301982/> [Internet]. 11 juill 2015 [cité 10 juin 2020]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/989195>
77. Hayward RE, Sullivan DJ, Day KP. *Plasmodium falciparum*: Histidine-Rich Protein II Is Expressed during Gametocyte Development. *Exp Parasitol.* nov 2000;96(3):139-46.

78. Makler MT, Hinrichs DJ. Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of *Plasmodium falciparum* as an Assessment of Parasitemia. *Am J Trop Med Hyg.* 1 févr 1993;48(2):205-10.
79. Infectiologie P le 29/06/2017 dans. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation : Mise à Jour 2017 des Recommandations pour la Pratique Clinique 2007 [Internet]. SRLF. 2017 [cité 10 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.srlf.org/prise-charge-prevention-paludisme-dimportation-mise-a-jour-2017-recommandations-pratique-clinique-2007/>
80. Berry A, Benoit-Vical F, Fabre R, Cassaing S, Magnaval JF. PCR-based methods to the diagnosis of imported malaria. *Parasite.* 1 sept 2008;15(3):484-8.
81. Reesink HW. European strategies against the parasite transfusion risk. *Transfus Clin Biol.* 1 févr 2005;12(1):1-4.
82. K C, K S, Npj D. Laboratory diagnosis of malaria infection - A short review of methods. *N Z J Med Lab Sci.* 1 avr 2007;61:4-7.
83. De Carvalho ME, Ferreira MU, De Souza MR, Ninomia RT, Matos GF, Camargo LM, et al. Malaria seroepidemiology: comparison between indirect fluorescent antibody test and enzyme immunoassay using bloodspot eluates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* juin 1992;87(2):205-8.
84. Tizifa TA, Kabaghe AN, McCann RS, van den Berg H, Van Vugt M, Phiri KS. Prevention Efforts for Malaria. *Curr Trop Med Rep.* 1 mars 2018;5(1):41-50.
85. Organization WH. Malaria elimination: a field manual for low and moderate endemic countries. *Malar Elimin Field Man Low Moderate Endem Ctries* [Internet]. 2007 [cité 11 juin 2020]; Disponible sur: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083233502>
86. Control T malERA CG on V. A Research Agenda for Malaria Eradication: Vector Control. *PLOS Med.* 25 janv 2011;8(1):e1000401.

87. WHO | WHO releases new guidance on insecticide-treated mosquito nets [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 11 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr43/en/>
88. WHO | World Malaria Report 2015 [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 11 juin 2020]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/>
89. WHO | Key points: World malaria report 2017 [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 11 juin 2020]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/en/>
90. Developing global maps of insecticide resistance risk to improve vector control [Internet]. [cité 11 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5320685/>
91. Global technical strategy for malaria 2016-2030 [Internet]. [cité 11 juin 2020]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/176712>
92. Fillinger U, Lindsay SW. Larval source management for malaria control in Africa: myths and reality. *Malar J*. 13 déc 2011;10(1):353.
93. Community-Based Promotional Campaign to Improve Uptake of Intermittent Preventive Antimalarial Treatment in Pregnancy in Burkina Faso | *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. [cité 11 juin 2020]. Disponible sur: <https://www-ajtmh-org.sirius.parisdescartes.fr/content/journals/10.4269/ajtmh.2009.80.460>
94. Tusting LS, Thwing J, Sinclair D, Fillinger U, Gimnig J, Bonner KE, et al. Mosquito larval source management for controlling malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 29 août 2013;(8):CD008923.
95. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - Malaria Worldwide - How Can Malaria Cases and Deaths Be Reduced? - Mass Drug Administration and Mass Fever Treatment [Internet]. 2019 [cité 11 juin 2020]. Disponible sur: https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/mda_mft.html

96. Chaccour CJ, Kobylinski KC, Bassat Q, Bousema T, Drakeley C, Alonso P, et al. Ivermectin to reduce malaria transmission: a research agenda for a promising new tool for elimination. *Malar J*. 7 mai 2013;12(1):153.
97. Sawadogo SP, Niang A, Bilgo E, Millogo A, Maïga H, Dabire RK, et al. Targeting male mosquito swarms to control malaria vector density. *PLOS ONE*. 9 mars 2017;12(3):e0173273.
98. Barreaux P, Barreaux AMG, Sternberg ED, Suh E, Waite JL, Whitehead SA, et al. Priorities for broadening the malaria vector control tool kit. *Trends Parasitol*. oct 2017;33(10):763-74.
99. Greenwood B. Elimination of malaria: halfway there. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1 janv 2017;111(1):1-2.
100. Draper SJ, Sack BK, King CR, Nielsen CM, Rayner JC, Higgins MK, et al. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host Microbe*. 11 juill 2018;24(1):43-56.
101. Nilsson SK, Childs LM, Buckee C, Marti M. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLoS Pathog* [Internet]. 18 juin 2015 [cité 17 juin 2020];11(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4472755/>
102. Vekemans J, Ballou WR. *Plasmodium falciparum* malaria vaccines in development. *Expert Rev Vaccines*. mars 2008;7(2):223-40.
103. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Aide P, et al. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 10 déc 2005;366(9502):2012-8.
104. Zheng J, Pan H, Gu Y, Zuo X, Ran N, Yuan Y, et al. Prospects for Malaria Vaccines: Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. *BioMed Res Int*. 3 oct 2019;2019:1-9.

105. Pringle JC, Carpi G, Almagro-Garcia J, Zhu SJ, Kobayashi T, Mulenga M, et al. RTS,S/AS01 malaria vaccine mismatch observed among *Plasmodium falciparum* isolates from southern and central Africa and globally. *Sci Rep*. 1 déc 2018;8(1):6622.
106. Genton B. Malaria vaccines: a toy for travelers or a tool for eradication? *Expert Rev Vaccines*. juill 2008;7(5):597-611.
107. WHO | Q&A on the malaria vaccine implementation programme (MVIP) [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 23 juin 2020]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/media/malaria-vaccine-implementation-qa/en/>
108. L'OMS recommande l'utilisation d'un vaccin antipaludique novateur destiné aux enfants exposés au risque de contracter la maladie [Internet]. [cité 18 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk>
109. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet*. 4 juill 2015;386(9988):31-45.
110. RTS,S [Internet]. PATH's Malaria Vaccine Initiative. 2015 [cité 23 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/rtss>
111. Nazeri S, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND. Naturally acquired immune responses to thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) of *Plasmodium vivax* in patients from areas of unstable malaria transmission. *Acta Trop*. 1 sept 2017;173:45-54.
112. Dundas K, Shears MJ, Sun Y, Hopp CS, Crosnier C, Metcalf T, et al. Alpha-v-containing integrins are host receptors for the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein, TRAP. *Proc Natl Acad Sci*. 24 avr 2018;115(17):4477-82.
113. Ewer KJ, O'Hara GA, Duncan CJA, Collins KA, Sheehy SH, Reyes-Sandoval A, et al. Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nat Commun*. 28 nov 2013;4(1):2836.

114. Hodgson SH, Ewer KJ, Bliss CM, Edwards NJ, Rampling T, Anagnostou NA, et al. Evaluation of the Efficacy of ChAd63-MVA Vectored Vaccines Expressing Circumsporozoite Protein and ME-TRAP Against Controlled Human Malaria Infection in Malaria-Naive Individuals. *J Infect Dis.* 1 avr 2015;211(7):1076-86.
115. Nicoll WS, Sacci JB, Rodolfo C, Di Giacomo G, Piacentini M, Holland ZJ, et al. *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1 is cross-linked by tissue transglutaminase. *Malar J.* 21 janv 2011;10(1):14.
116. Krzych U, Lyon JA, Jareed T, Schneider I, Hollingdale MR, Gordon DM, et al. T lymphocytes from volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens. *J Immunol.* 15 oct 1995;155(8):4072-7.
117. Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J.* 9 janv 2012;11(1):11.
118. Prieur E, Druilhe P. The malaria candidate vaccine liver stage antigen-3 is highly conserved in *Plasmodium falciparum* isolates from diverse geographical areas. *Malar J.* 29 oct 2009;8(1):247.
119. Toure-Balde A, Perlaza B-L, Sauzet J-P, Ndiaye M, Aribot G, Tall A, et al. Evidence for Multiple B- and T-Cell Epitopes in *Plasmodium falciparum* Liver-Stage Antigen 3. *Infect Immun.* 1 mars 2009;77(3):1189-96.
120. Mordmüller B, Surat G, Lagler H, Chakravarty S, Ishizuka AS, Lalremruata A, et al. Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature.* févr 2017;542(7642):445-9.
121. Epstein JE, Paolino KM, Richie TL, Sedegah M, Singer A, Ruben AJ, et al. Protection against *Plasmodium falciparum* malaria by PfSPZ Vaccine. *JCI Insight* [Internet]. 12 janv 2017 [cité 30 juin 2020];2(1). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/89154>

122. Weiss GE, Crabb BS, Gilson PR. Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. *Trends Parasitol.* avr 2016;32(4):284-95.
123. Pizarro JC, Chitarra V, Verger D, Holm I, Pêtres S, Dartevelle S, et al. Crystal Structure of a Fab Complex Formed with PfMSP1-19, the C-terminal Fragment of Merozoite Surface Protein 1 from *Plasmodium falciparum*: A Malaria Vaccine Candidate. *J Mol Biol.* 16 mai 2003;328(5):1091-103.
124. Burns JM, Miura K, Sullivan J, Long CA, Barnwell JW. Immunogenicity of a chimeric *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein vaccine in Aotus monkeys. *Malar J.* 15 mars 2016;15(1):159.
125. Goodman AL, Draper SJ. Blood-stage malaria vaccines — recent progress and future challenges. *Ann Trop Med Parasitol.* 1 avr 2010;104(3):189-211.
126. Yang ASP, Lopaticki S, O'Neill MT, Erickson SM, Douglas DN, Kneteman NM, et al. AMA1 and MAEBL are important for *Plasmodium falciparum* sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol.* 2017;19(9):e12745.
127. Genton B, Al-Yaman F, Betuela I, Anders RF, Saul A, Baea K, et al. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. *Vaccine.* 8 déc 2003;22(1):30-41.
128. Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Dicko A, Smith DL, Guindo AB, et al. Dynamics of Polymorphism in a Malaria Vaccine Antigen at a Vaccine-Testing Site in Mali. *PLOS Med.* 13 mars 2007;4(3):e93.
129. Galaway F, Drought LG, Fala M, Cross N, Kemp AC, Rayner JC, et al. P113 is a merozoite surface protein that binds the N terminus of *Plasmodium falciparum* RH5. *Nat Commun.* 10 2017;8:14333.
130. Alanine DGW, Quinkert D, Kumarasingha R, Mehmood S, Donnellan FR, Minkah NK, et al. Human Antibodies that Slow Erythrocyte Invasion Potentiate Malaria-Neutralizing Antibodies. *Cell.* 27 2019;178(1):216-228.e21.

131. Jin J, Tarrant RD, Bolam EJ, Angell-Manning P, Soegaard M, Pattinson DJ, et al. Production, quality control, stability, and potency of cGMP-produced *Plasmodium falciparum* RH5.1 protein vaccine expressed in *Drosophila* S2 cells. *Npj Vaccines*. 17 août 2018;3(1):1-13.
132. Hill CA, Kafatos FC, Stansfield SK, Collins FH. Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era. *Nat Rev Microbiol*. mars 2005;3(3):262-8.
133. Long CA, Zavala F. Malaria Vaccines and Human Immune Responses. *Curr Opin Microbiol*. août 2016;32:96-102.
134. Sherrard-Smith E, Sala KA, Betancourt M, Upton LM, Angrisano F, Morin MJ, et al. Synergy in anti-malarial pre-erythrocytic and transmission-blocking antibodies is achieved by reducing parasite density. 19 juin 2018 [cité 10 juill 2020]; Disponible sur: <http://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/60240>
135. Lee S-M, Wu C-K, Plieskatt J, McAdams DH, Miura K, Ockenhouse C, et al. Assessment of Pfs25 expressed from multiple soluble expression platforms for use as transmission-blocking vaccine candidates. *Malar J*. 11 août 2016;15(1):405.
136. Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, Fontes E, Malkin EM, Mahanty S, et al. Phase 1 Trial of Malaria Transmission Blocking Vaccine Candidates Pfs25 and Pvs25 Formulated with Montanide ISA 51. *PLOS ONE*. 9 juill 2008;3(7):e2636.
137. Li Y, Leneghan DB, Miura K, Nikolaeva D, Brian IJ, Dicks MDJ, et al. Enhancing immunogenicity and transmission-blocking activity of malaria vaccines by fusing Pfs25 to IMX313 multimerization technology. *Sci Rep*. 8 janv 2016;6(1):18848.
138. Jones CS, Luong T, Hannon M, Tran M, Gregory JA, Shen Z, et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol*. mars 2013;97(5):1987-95.
139. Acquah FK, Obboh EK, Asare K, Boampong JN, Nuvor SV, Singh SK, et al. Antibody responses to two new *Lactococcus lactis*-produced recombinant Pfs48/45 and Pfs230

- proteins increase with age in malaria patients living in the Central Region of Ghana. *Malar J.* 1 août 2017;16(1):306.
140. Improving the Malaria Transmission-Blocking Activity of a *Plasmodium falciparum* 48/45 Based Vaccine Antigen by SpyTag/SpyCatcher Mediated Virus-Like Display - PubMed [Internet]. [cité 10 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.sirius.parisdescartes.fr/28578824/>
 141. Mueller I, Shakri AR, Chitnis CE. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine.* 22 déc 2015;33(52):7489-95.
 142. White M, Amino R, Mueller I. Theoretical Implications of a Pre-Erythrocytic *Plasmodium vivax* Vaccine for Preventing Relapses. *Trends Parasitol.* avr 2017;33(4):260-3.
 143. Arévalo-Herrera M, Vásquez-Jiménez JM, Lopez-Perez M, Vallejo AF, Amado-Garavito AB, Céspedes N, et al. Protective Efficacy of *Plasmodium vivax* Radiation-Attenuated Sporozoites in Colombian Volunteers: A Randomized Controlled Trial. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 19 oct 2016 [cité 10 juill 2020];10(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5070852/>
 144. Bennett JW, Yadava A, Tosh D, Sattabongkot J, Komisar J, Ware LA, et al. Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 26 févr 2016 [cité 10 juill 2020];10(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4769081/>
 145. Vanloubbeeck Y, Pichyangkul S, Bayat B, Yongvanitchit K, Bennett JW, Sattabongkot J, et al. Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate *Plasmodium vivax* circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. *Vaccine.* 16 déc 2013;31(52):6216-24.
 146. Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KSW, Suwanarusk R, Claser C, et al. *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. *Blood.* 19 févr 2015;125(8):1314-24.

147. Payne RO, Silk SE, Elias SC, Milne KH, Rawlinson TA, Llewellyn D, et al. Human vaccination against *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. JCI Insight [Internet]. [cité 10 juill 2020];2(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5470884/>
148. June 2 PR, Pm 2015 at 10:12. Antimalarial Drugs [Internet]. Malaria Site. 2015 [cité 11 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.malariasite.com/malaria-drugs/>
149. Dardé M-L, Fougère É, Buxeraud J. Les antipaludiques. Actual Pharm. 1 déc 2018;57(581, Supplement):27-37.
150. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. Nat Rev Immunol. nov 2014;14(11):744-57.
151. Liehl P, Meireles P, Albuquerque IS, Pinkevych M, Baptista F, Mota MM, et al. Innate Immunity Induced by *Plasmodium* Liver Infection Inhibits Malaria Reinfections. Infect Immun. 1 mars 2015;83(3):1172-80.
152. Schreiber G, Tel J, Sliepen KHEWJ, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, et al. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 1 oct 2010;59(10):1573-82.
153. Gowda DC, Wu X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. Front Immunol. 2018;9:3006.
154. Liehl P, Zuzarte-Luís V, Chan J, Zillinger T, Baptista F, Carapau D, et al. Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. Nat Med. janv 2014;20(1):47-53.
155. Interferon-Mediated Innate Immune Responses against Malaria Parasite Liver Stages: Cell Reports [Internet]. [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(14\)00196](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(14)00196)

156. Yu X, Cai B, Wang M, Tan P, Ding X, Wu J, et al. Cross-Regulation of Two Type I Interferon Signaling Pathways in Plasmacytoid Dendritic Cells Controls Anti-malaria Immunity and Host Mortality. *Immunity*. 15 nov 2016;45(5):1093-107.
157. Malaria-Induced NLRP12/NLRP3-Dependent Caspase-1 Activation Mediates Inflammation and Hypersensitivity to Bacterial Superinfection [Internet]. [cité 7 juill 2020]. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003885>
158. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. Characterization of Heme as Activator of Toll-like Receptor 4. *J Biol Chem*. 13 juill 2007;282(28):20221-9.
159. Couper KN, Barnes T, Hafalla JCR, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-Derived Plasma Microparticles Contribute Significantly to Malaria Infection-Induced Inflammation through Potent Macrophage Stimulation. *PLOS Pathog*. 29 janv 2010;6(1):e1000744.
160. TLRs and innate immunity | Blood | American Society of Hematology [Internet]. [cité 7 juill 2020]. Disponible sur: <https://ashpublications.org/blood/article/113/7/1399/25973/TLRs-and-innate-immunity>
161. Skorokhod OA, Alessio M, Mordmüller B, Arese P, Schwarzer E. Hemozoin (Malarial Pigment) Inhibits Differentiation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells: A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Mediated Effect. *J Immunol*. 15 sept 2004;173(6):4066-74.
162. Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, Giribaldi G, Ginsburg H, Arese P. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med*. 1 oct 1992;176(4):1033-41.
163. Gupta P, Lai SM, Sheng J, Tetlak P, Balachander A, Claser C, et al. Tissue-Resident CD169(+) Macrophages Form a Crucial Front Line against *Plasmodium* Infection. *Cell Rep*. 09 2016;16(6):1749-61.

164. Baccarella A, Huang BW, Fontana MF, Kim CC. Loss of Toll-like receptor 7 alters cytokine production and protects against experimental cerebral malaria. *Malar J*. 5 sept 2014;13(1):354.
165. Kim CC, Nelson CS, Wilson EB, Hou B, DeFranco AL, DeRisi JL. Splenic Red Pulp Macrophages Produce Type I Interferons as Early Sentinels of Malaria Infection but Are Dispensable for Control. *PLOS ONE*. 29 oct 2012;7(10):e48126.
166. Spaulding E, Fooksman D, Moore JM, Saidi A, Feintuch CM, Reizis B, et al. STING-Licensed Macrophages Prime Type I IFN Production by Plasmacytoid Dendritic Cells in the Bone Marrow during Severe *Plasmodium yoelii* Malaria. *PLOS Pathog*. 28 oct 2016;12(10):e1005975.
167. Haque A, Best SE, Oca MM de, James KR, Ammerdorffer A, Edwards CL, et al. Type I IFN signaling in CD8⁻ DCs impairs Th1-dependent malaria immunity. *J Clin Invest*. 2 juin 2014;124(6):2483-96.
168. Type I interferons suppress CD4⁺ T-cell-dependent parasite control during blood-stage *Plasmodium* infection - Haque - 2011 - *European Journal of Immunology* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 7 juill 2020]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201141539>
169. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*. févr 2015;15(2):87-103.
170. Walsh KP, Mills KHG. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol*. 1 nov 2013;34(11):521-30.
171. King T, Lamb T. Interferon- γ : The Jekyll and Hyde of Malaria. *PLOS Pathog*. 1 oct 2015;11(10):e1005118.
172. Wilson KEM and EH. Role of Chemokines and Trafficking of Immune Cells in Parasitic Infections [Internet]. Vol. 9, *Current Immunology Reviews*. 2013 [cité 7 juill 2020]. p. 157-68. Disponible sur: <https://www.eurekaselect.com/118954/article>

173. Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol.* 2006;28(1-2):35-49.
174. Wolf A-S, Sherratt S, Riley EM. NK Cells: Uncertain Allies against Malaria. *Front Immunol* [Internet]. 2017 [cité 9 juill 2020];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00212/full>
175. Clark IA, Alleva LM, Budd AC, Cowden WB. Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. *Travel Med Infect Dis.* 1 janv 2008;6(1):67-81.
176. Engwerda CR, Good MF. Interactions between malaria parasites and the host immune system. *Curr Opin Immunol.* 1 août 2005;17(4):381-7.
177. Cutting Edge: Conventional Dendritic Cells Are the Critical APC Required for the Induction of Experimental Cerebral Malaria | *The Journal of Immunology* [Internet]. [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.jimmunol.org/content/178/10/6033.short>
178. Kurup SP, Butler NS, Harty JT. T cell-mediated immunity to malaria. *Nat Rev Immunol.* juill 2019;19(7):457-71.
179. Rotman HL, Daly TM, Clynes R, Long CA. Fc Receptors Are Not Required for Antibody-Mediated Protection Against Lethal Malaria Challenge in a Mouse Model. *J Immunol.* 15 août 1998;161(4):1908-12.
180. Bull PC, Marsh K. The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. *Trends Microbiol.* 1 févr 2002;10(2):55-8.
181. The immunological challenge to developing a vaccine to the blood stages of malaria parasites - Good - 2004 - *Immunological Reviews* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.0105-2896.2004.00178.x>

182. Druilhe P, Pradier O, Marc JP, Miltgen F, Mazier D, Parent G. Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. *Infect Immun.* août 1986;53(2):393-7.
183. Hollingdale MR, Hogg B, Petersen E, Wirtz RA, Bjorkmann A. Age-dependent occurrence of protective anti-*Plasmodium falciparum* sporozoite antibodies in a holoendemic area of Liberia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* juin 1989;83(3):322-4.
184. Anti-sporozoite Antibodies and Immunity to Malaria in a Rural Gambian Population - PubMed [Internet]. [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/sirius.parisdescartes.fr/2475928/>
185. Characterization of *Plasmodium falciparum* Sporozoite Surface Protein 2 - PubMed [Internet]. [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/sirius.parisdescartes.fr/1409621/>
186. John CC, Zickafoose JS, Sumba PO, King CL, Kazura JW. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigens circumsporozoite protein, thrombospondin-related adhesive protein, and liver-stage antigen 1 vary by ages of subjects and by season in a highland area of Kenya. *Infect Immun.* août 2003;71(8):4320-5.
187. Dolo A, Modiano D, Doumbo O, Bosman A, Sidibé T, Keita MM, et al. Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), a potential malaria vaccine candidate. *Parassitologia.* sept 1999;41(1-3):425-8.
188. Kurtis JD, Hollingdale MR, Luty AJ, Lanar DE, Krzych U, Duffy PE. Pre-erythrocytic immunity to *Plasmodium falciparum*: the case for an LSA-1 vaccine. *Trends Parasitol.* mai 2001;17(5):219-23.
189. Domarle O, Migot-Nabias F, Mvoukani JL, Lu CY, Nabias R, Mayombo J, et al. Factors influencing resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* déc 1999;61(6):926-31.

190. Crompton PD, Kayala MA, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss GE, et al. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. Proc Natl Acad Sci U S A. 13 avr 2010;107(15):6958-63.
191. Obeng-Adjei N, Portugal S, Tran TM, Yazew TB, Skinner J, Li S, et al. Circulating Th1 cell-type Tfh cells that exhibit impaired B cell help are preferentially activated during acute malaria in children. Cell Rep. 13 oct 2015;13(2):425-39.
192. Tian Y, Mollo SB, Harrington LE, Zajac AJ. IL-10 Regulates Memory T Cell Development and the Balance between Th1 and Follicular Th Cell Responses during an Acute Viral Infection. J Immunol Baltim Md 1950. 15 2016;197(4):1308-21.
193. Cai G, Nie X, Zhang W, Wu B, Lin J, Wang H, et al. A Regulatory Role for IL-10 Receptor Signaling in Development and B Cell Help of T Follicular Helper Cells in Mice. J Immunol. 1 août 2012;189(3):1294-302.
194. Moormann AM, Nixon CE, Forconi CS. Immune effector mechanisms in malaria: An update focusing on human immunity. Parasite Immunol. 2019;41(8):e12628.
195. Breadth and Magnitude of Antibody Responses to Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Antigens Are Associated with Protection from Clinical Malaria [Internet]. [cité 7 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sirius.parisdescartes.fr/pmc/articles/PMC2346713/>
196. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. J Exp Med. 1 déc 1990;172(6):1633-41.
197. Duraisingh MT, Triglia T, Ralph SA, Rayner JC, Barnwell JW, McFadden GI, et al. Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. EMBO J. 3 mars 2003;22(5):1047-57.

198. Stubbs J, Simpson KM, Triglia T, Plouffe D, Tonkin CJ, Duraisingh MT, et al. Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science*. 26 août 2005;309(5739):1384-7.
199. Variation in Use of Erythrocyte Invasion Pathways by *Plasmodium falciparum* Mediates Evasion of Human Inhibitory Antibodies - PubMed [Internet]. [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18064303/>
200. Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 août 1992;89(15):7085-9.
201. Grimberg BT, Udomsangpetch R, Xainli J, McHenry A, Panichakul T, Sattabongkot J, et al. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med*. déc 2007;4(12):e337.
202. King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 juin 2008;105(24):8363-8.
203. Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, Pein O, Santos NR, Pereira da Silva LH, et al. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. mai 2006;74(5):2726-33.
204. The Risk of Malarial Infections and Disease in Papua New Guinean Children - PubMed [Internet]. [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17556601/>
205. Beeson JG, Brown GV. Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell Mol Life Sci CMLS*. févr 2002;59(2):258-71.

206. Biggs BA, Goozé L, Wycherley K, Wollish W, Southwell B, Leech JH, et al. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 oct 1991;88(20):9171-4.
207. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, et al. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. Cell. 14 juill 1995;82(1):101-10.
208. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. Nat Med. mars 1998;4(3):358-60.
209. Demonstrations. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1 janv 1969;63(1):1-24.
210. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. Am J Trop Med Hyg. 1 janv 2001;64(1_suppl):28-35.
211. A community randomized controlled trial of insecticide-treated bednets for the prevention of malaria and anaemia among primigravid women on the Kenyan coast. - Abstract - Europe PMC [Internet]. [cité 13 juill 2020]. Disponible sur: <https://europepmc-org.sirius.parisdescartes.fr/article/med/9593358>
212. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoia K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. Lancet Infect Dis. févr 2007;7(2):93-104.
213. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menéndez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The Sick Placenta—The Role of Malaria. Placenta. 1 mai 2004;25(5):359-78.
214. Menendez C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. Parasitol Today Pers Ed. mai 1995;11(5):178-83.

215. Singh N, Mehra RK, Srivastava N. Malaria during pregnancy and infancy, in an area of intense malaria transmission in central India. *Ann Trop Med Parasitol.* janv 2001;95(1):19-29.
216. Luxemburger C, McGready R, Kham A, Morison L, Cho T, Chongsuphajaisiddhi T, et al. Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in an area of low malaria transmission. *Am J Epidemiol.* 1 sept 2001;154(5):459-65.
217. Steketee RW, Wirima JJ, Hightower AW, Slutsker L, Heymann DL, Breman JG. The effect of malaria and malaria prevention in pregnancy on offspring birthweight, prematurity, and intrauterine growth retardation in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(1 Suppl):33-41.
218. Okoko BJ, Ota MO, Yamuah LK, Idiong D, Mkpnam SN, Avieka A, et al. Influence of placental malaria infection on foetal outcome in the Gambia: twenty years after Ian Mcgregor. *J Health Popul Nutr.* mars 2002;20(1):4-11.
219. Nosten F, ter Kuile F, Maelankirri L, Decludt B, White NJ. Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* août 1991;85(4):424-9.
220. Walker-Abbey A, Djokam RRT, Eno A, Leke RFG, Titanji VPK, Fogako J, et al. MALARIA IN PREGNANT CAMEROONIAN WOMEN: THE EFFECT OF AGE AND GRAVIDITY ON SUBMICROSCOPIC AND MIXED-SPECIES INFECTIONS AND MULTIPLE PARASITE GENOTYPES. *Am J Trop Med Hyg.* 1 mars 2005;72(3):229-35.
221. Mayor A, Bardají A, Felger I, King CL, Cisteró P, Dobaño C, et al. Placental Infection With *Plasmodium vivax*: A Histopathological and Molecular Study. *J Infect Dis.* 15 déc 2012;206(12):1904-10.
222. Carmona-Fonseca J, Arango E, Maestre A. Placental Malaria in Colombia: Histopathologic Findings in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* Infections. *Am J Trop Med Hyg.* 5 juin 2013;88(6):1093-101.

223. Ayres Pereira M, Mandel Clausen T, Pehrson C, Mao Y, Resende M, Daugaard M, et al. Placental Sequestration of *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Is Mediated by the Interaction Between VAR2CSA and Chondroitin Sulfate A on Syndecan-1. Rowe JA, éditeur. PLOS Pathog. 24 août 2016;12(8):e1005831.
224. Pehrson C, Mathiesen L, Heno KK, Salanti A, Resende M, Dzikowski R, et al. Adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in ex vivo perfused placental tissue: a novel model of placental malaria. Malar J. 26 mai 2016;15(1):292.
225. Doritchamou J, Bertin G, Moussiliou A, Bigey P, Viwami F, Ezinmagnon S, et al. First-trimester *Plasmodium falciparum* infections display a typical « placental » phenotype. J Infect Dis. 15 déc 2012;206(12):1911-9.
226. Doritchamou J, Sossou-tchatcha S, Cottrell G, Moussiliou A, Houngbeme CH, Massougbdji A, et al. Dynamics in the Cytoadherence Phenotypes of *Plasmodium falciparum* Infected Erythrocytes Isolated during Pregnancy. PLOS ONE. 6 juin 2014;9(6):e98577.
227. Tuikue-Ndam N, Deloron P. Developing vaccines to prevent malaria in pregnant women. Expert Opin Biol Ther. 2015;15(8):1173-82.
228. Sugiura N, Clausen TM, Shioiri T, Gustavsson T, Watanabe H, Salanti A. Molecular dissection of placental malaria protein VAR2CSA interaction with a chemoenzymatically synthesized chondroitin sulfate library. Glycoconj J. 1 déc 2016;33(6):985-94.
229. Stanistic DI, Moore KA, Baiwog F, Ura A, Clapham C, King CL, et al. Risk factors for malaria and adverse birth outcomes in a prospective cohort of pregnant women resident in a high malaria transmission area of Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg. mai 2015;109(5):313-24.
230. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RFG, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. Lancet Infect Dis. févr 2007;7(2):105-17.

231. Walker PGT, Griffin JT, Cairns M, Rogerson SJ, van Eijk AM, ter Kuile F, et al. A model of parity-dependent immunity to placental malaria. *Nat Commun.* 19 mars 2013;4(1):1609.
232. An Autopsy Study of Maternal Mortality in Mozambique: The Contribution of Infectious Diseases [Internet]. [cité 14 août 2020]. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050044>
233. Castillo P, Menéndez C, Mayor A, Carrilho C, Ismail MR, Lorenzoni C, et al. Massive *Plasmodium falciparum* visceral sequestration: a cause of maternal death in Africa. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* nov 2013;19(11):1035-41.
234. Transcription of var Genes Other Than var2csa in *Plasmodium falciparum* Parasites Infecting Mozambican Pregnant Women [Internet]. [cité 14 août 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3307158/>
235. Ndam NT, Bischoff E, Proux C, Lavstsen T, Salanti A, Guitard J, et al. *Plasmodium falciparum* Transcriptome Analysis Reveals Pregnancy Malaria Associated Gene Expression. *PLOS ONE.* 26 mars 2008;3(3):e1855.
236. Does Malaria Affect Placental Development? Evidence from In Vitro Models [Internet]. [cité 14 août 2020]. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055269>
237. Briand V, Saal J, Ghafari C, Huynh B-T, Fievet N, Schmiegelow C, et al. Fetal Growth Restriction Is Associated With Malaria in Pregnancy: A Prospective Longitudinal Study in Benin. *J Infect Dis.* 01 2016;214(3):417-25.
238. Landis SH, Lokomba V, Ananth CV, Atibu J, Ryder RW, Hartmann KE, et al. Impact of maternal malaria and under-nutrition on intrauterine growth restriction: a prospective ultrasound study in Democratic Republic of Congo. *Epidemiol Infect.* févr 2009;137(2):294-304.
239. Chaikitgosiyakul S, Rijken MJ, Muehlenbachs A, Lee SJ, Chaisri U, Viriyavejakul P, et al. A morphometric and histological study of placental malaria shows significant

changes to villous architecture in both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infection. *Malar J.* 4 janv 2014;13(1):4.

240. Chandrasiri UP, Chua CLL, Umbers AJ, Chaluluka E, Glazier JD, Rogerson SJ, et al. Insight into the pathogenesis of fetal growth restriction in placental malaria: decreased placental glucose transporter isoform 1 expression. *J Infect Dis.* 15 mai 2014;209(10):1663-7.
241. Boeuf P, Aitken EH, Chandrasiri U, Chua CLL, McInerney B, McQuade L, et al. *Plasmodium falciparum* Malaria Elicits Inflammatory Responses that Dysregulate Placental Amino Acid Transport. *PLOS Pathog.* 7 févr 2013;9(2):e1003153.
242. Conroy A, Serghides L, Finney C, Owino SO, Kumar S, Gowda DC, et al. C5a Enhances Dysregulated Inflammatory and Angiogenic Responses to Malaria In Vitro: Potential Implications for Placental Malaria. *PLOS ONE.* 24 mars 2009;4(3):e4953.
243. Rogerson SJ, Desai M, Mayor A, Sicuri E, Taylor SM, van Eijk AM. Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for an old problem. *Lancet Infect Dis.* avr 2018;18(4):e107-18.
244. Ntirushwa D. A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African region. :7.
245. Desai M, Gutman J, Taylor SM, Wiegand RE, Khairallah C, Kayentao K, et al. Impact of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance on Effectiveness of Intermittent Preventive Therapy for Malaria in Pregnancy at Clearing Infections and Preventing Low Birth Weight. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 févr 2016;62(3):323-33.
246. Agarwal K, Alonso P, Chico RM, Coleman J, Dellicour S, Hill J, et al. Global Call to Action to scale-up coverage of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: seminar report. *Malar J.* 18 mai 2015;14:206.
247. Rogerson SJ. Management of malaria in pregnancy. *Indian J Med Res.* sept 2017;146(3):328-33.

248. Organisation mondiale de la santé. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization; 2015.
249. Clark RL. Animal Embryotoxicity Studies of Key Non-Artemisinin Antimalarials and Use in Women in the First Trimester. *Birth Defects Res.* 15 août 2017;109(14):1075-126.
250. PREGACT Study Group, Pekyi D, Ampromfi AA, Tinto H, Traoré-Coulibaly M, Tahita MC, et al. Four Artemisinin-Based Treatments in African Pregnant Women with Malaria. *N Engl J Med.* 10 mars 2016;374(10):913-27.
251. Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Sugiarto P, Tjitra E, et al. Treatment policy change to dihydroartemisinin-piperaquine contributes to the reduction of adverse maternal and pregnancy outcomes. *Malar J.* 15 juill 2015;14:272.
252. Sacks G, Sargent I, Redman C. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today.* mars 1999;20(3):114-8.
253. Bouteiller PL, Tabiasco J. Immunologie de la grossesse : faits nouveaux. *médecine/sciences.* 1 août 2006;22(8-9):745-50.
254. Vinatier D, Monnier JC. [The fetal-maternal interface. Description of its elements from an immunologic perspective]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 1990;19(6):691-700.
255. Holmes CH, Simpson KL, Okada H, Okada N, Wainwright SD, Purcell DF, et al. Complement regulatory proteins at the feto-maternal interface during human placental development: distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). *Eur J Immunol.* juin 1992;22(6):1579-85.
256. Immunité de la gestation : nouveaux concepts – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps [Internet]. [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <http://www.academie-medecine.fr/immunite-de-la-gestation-nouveaux-concepts/>

257. Placental Cell Expression of HLA-G2 Isoforms Is Limited to the Invasive Trophoblast Phenotype | The Journal of Immunology [Internet]. [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <https://www-jimmunol-org.sirius.parisdescartes.fr/content/171/11/6215>
258. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation - Contini - 2003 - European Journal of Immunology - Wiley Online Library [Internet]. [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <https://onlinelibrary-wiley-com.sirius.parisdescartes.fr/doi/full/10.1002/immu.200390015>
259. Pröll J, Bensussan A, Goffin F, Foidart J-M, Berrebi A, Bouteiller PL. Tubal versus uterine placentation: similar HLA-G expressing extravillous cytotrophoblast invasion but different maternal leukocyte recruitment. *Tissue Antigens*. 2000;56(6):479-91.
260. Transforming growth factor- β in the early mouse embryo: Implications for the regulation of muscle formation and implantation - Slager - 1993 - Developmental Genetics - Wiley Online Library [Internet]. [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <https://onlinelibrary-wiley-com.sirius.parisdescartes.fr/doi/abs/10.1002/dvg.1020140308>
261. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol*. 1 juin 2001;1(6):1037-48.
262. Jiang SP, Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal « allograft ». *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 avr 1998;160(7):3086-90.
263. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic | PNAS [Internet]. [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <https://www-pnas-org.sirius.parisdescartes.fr/content/102/43/15563.short>
264. Rabot M, Tabiasco J, Polgar B, Aguerre-Girr M, Berrebi A, Bensussan A, et al. HLA Class I/NK Cell Receptor Interaction in Early Human Decidua basalis: Possible Functional Consequences. *Immunol Pregnancy*. 2005;89:72-83.
265. Trophoblast Cell Line Resistance to NK Lysis Mainly Involves an HLA Class I-Independent Mechanism | The Journal of Immunology [Internet]. [cité 16 juill 2020].

Disponible sur: <https://www.jimmunol-org.sirius.parisdescartes.fr/content/162/10/5902.short>

266. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Funai EF, Mor G. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol Hum Reprod.* 1 janv 2004;10(1):33-41.
267. Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody « 87G » and anti-cytokeratin antibody « CAM5.2 ». *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. déc 1996;36(6):349-58.
268. Johansson M, Bromfield JJ, Jasper MJ, Robertson SA. Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. *Immunology.* juin 2004;112(2):290-300.
269. Morgan M, Kniss D, McDonnell S. Expression of Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Trophoblast Continuous Cell Lines. *Exp Cell Res.* 10 juill 1998;242(1):18-26.
270. Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. avr 2002;47(4):213-21.
271. The role of cytokines in gestation - PubMed [Internet]. [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.sirius.parisdescartes.fr/7755875/>
272. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci.* mars 2011;1221:80-7.
273. Makkar G, Ng EHY, Yeung WSB, Ho PC. Reduced Expression of Interleukin-11 and Interleukin-6 in the Periimplantation Endometrium of Excessive Ovarian Responders during in Vitro Fertilization Treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 août 2006;91(8):3181-8.

274. Králíčková M, Šíma P, Rokyta Z. Role of the leukemia-inhibitory factor gene mutations in infertile women: The embryo-endometrial cytokine cross talk during implantation — a delicate homeostatic equilibrium. *Folia Microbiol (Praha)*. 1 mai 2005;50(3):179-86.
275. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*. sept 2006;12(9):1065-74.
276. Chaouat G, Cayol V, Mairovitz V, Dubanchet S. Localization of the Th2 Cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the Fetomaternal Interface During Human and Murine Pregnancy and Lack of Requirement for Fas/Fas Ligand Interaction for a Successful Allogeneic Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1999;42(1):1-13.
277. Halonen M, Lohman IC, Stern DA, Spangenberg A, Anderson D, Mobley S, et al. Th1/Th2 Patterns and Balance in Cytokine Production in the Parents and Infants of a Large Birth Cohort. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 mars 2009;182(5):3285-93.
278. Kayem G, Batteux F. *Immunologie de la grossesse*. Presse Médicale. nov 2008;37(11):1612-9.
279. Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Kahigwa E, Hirt R, Cardesa A, et al. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol*. août 1998;22(8):1006-11.
280. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance - PubMed [Internet]. [cité 27 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.sirius.parisdescartes.fr/11050008/>
281. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacín A, Kahigwa E, et al. Placental Malaria Is Associated with Cell-Mediated Inflammatory Responses with Selective Absence of Natural Killer Cells. *J Infect Dis*. avr 2001;183(7):1100-7.

282. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes - PubMed [Internet]. [cité 27 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.sirius.parisdescartes.fr/12556159/>
283. Beeson JG, Duffy PE. The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;297:187-227.
284. Gamain B, Smith JD, Viebig NK, Gysin J, Scherf A. Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. *Int J Parasitol*. mars 2007;37(3-4):273-83.
285. Fowkes FJ, McGready R, Cross NJ, Hommel M, Simpson JA, Elliott SR, et al. New Insights into Acquisition, Boosting, and Longevity of Immunity to Malaria in Pregnant Women. *J Infect Dis*. 15 nov 2012;206(10):1612-21.
286. Suguitan AL, Leke RGF, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, et al. Changes in the Levels of Chemokines and Cytokines in the Placentas of Women with *Plasmodium falciparum* Malaria. *J Infect Dis*. 1 oct 2003;188(7):1074-82.
287. Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE. Malaria Elicits Type 1 Cytokines in the Human Placenta: IFN- γ and TNF- α Associated with Pregnancy Outcomes. *J Immunol*. 1 mars 1998;160(5):2523-30.
288. Taylor-Robinson AW, Smith EC. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunol Lett*. 15 mars 1999;67(1):1-9.
289. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GDH, Tadesse E, Lema VM, et al. Host Response to Malaria During Pregnancy: Placental Monocyte Recruitment Is Associated with Elevated β Chemokine Expression. *J Immunol*. 1 mars 2003;170(5):2759-64.

290. Suguitan, Jr. AL, Leke RGF, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, et al. Changes in the Levels of Chemokines and Cytokines in the Placentas of Women with *Plasmodium falciparum* Malaria. *J Infect Dis.* oct 2003;188(7):1074-7082.
291. Moore JM, Nahlen BL, Misore A, Lal AA, Udhayakumar V. Immunity to placental malaria. I. Elevated production of interferon-gamma by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria. *J Infect Dis.* mai 1999;179(5):1218-25.
292. Yasnot MF, Perkins DJ, Corredor M, Yanow S, Carmona-Fonseca J, Maestre A. The Effects of *Plasmodium vivax* Gestational Malaria on the Clinical and Immune Status of Pregnant Women in Northwestern Colombia. *Colomb Médica CM.* 44(3):172-7.
293. Davison BB, Kaack MB, Rogers LB, Rasmussen KK, Rasmussen TA, Henson EW, et al. The role of soluble tumor necrosis factor receptor types I and II and tumor necrosis factor-alpha in malaria during pregnancy. *J Infect Dis.* 1 juill 2006;194(1):123-32.
294. Renaud SJ, Sullivan R, Graham CH. Tumour Necrosis Factor Alpha Stimulates the Production of Monocyte Chemoattractants by Extravillous Trophoblast Cells via Differential Activation of MAPK Pathways. *Placenta.* 1 avr 2009;30(4):313-9.
295. Jangpatarapongsa K, Xia H, Fang Q, Hu K, Yuan Y, Peng M, et al. Immunity to Malaria in *Plasmodium vivax* Infection: A Study in Central China. *PLOS ONE.* 25 sept 2012;7(9):e45971.
296. Antibodies to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 5 in Indonesia: Species-Specific and Cross-Reactive Responses | *The Journal of Infectious Diseases* | Oxford Academic [Internet]. [cité 27 juill 2020]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/jid/article/198/1/134/840597>
297. Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol CVI.* mars 2006;13(3):376-9.

298. Diversity of Agglutinating Phenotype, Cytoadherence, and Rosette-Forming Characteristics of *Plasmodium falciparum* Isolates from Papua New Guinean Children | The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene [Internet]. [cité 27 juill 2020]. Disponible sur: <http://www.ajtmh.org.sirius.parisdescartes.fr/content/journals/10.4269/ajtmh.1994.51.45>
299. *Plasmodium falciparum* Isolates from Infected Pregnant Women and Children Are Associated with Distinct Adhesive and Antigenic Properties [Internet]. [cité 27 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih-gov.sirius.parisdescartes.fr/pmc/articles/PMC2613477/>
300. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature*. 29 oct 1998;395(6705):851-2.
301. Staalsoe T, Giha HA, Dodoo D, Theander TG, Hviid L. Detection of antibodies to variant antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by flow cytometry. *Cytometry*. 1999;35(4):329-36.
302. Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A - PubMed [Internet]. [cité 27 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih-gov.sirius.parisdescartes.fr/10975848/>
303. Staalsoe T, Megnekou R, Fievét N, Ricke CH, Zornig HD, Leke R, et al. Acquisition and decay of antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes that protect against placental parasitemia. *J Infect Dis*. 1 sept 2001;184(5):618-26.
304. Staalsoe T, Shulman CE, Bulmer JN, Kawuondo K, Marsh K, Hviid L. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Lond Engl*. 24 janv 2004;363(9405):283-9.

305. Beeson JG, Mann EJ, Elliott SR, Lema VM, Tadesse E, Molyneux ME, et al. Antibodies to Variant Surface Antigens of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes and Adhesion Inhibitory Antibodies Are Associated with Placental Malaria and Have Overlapping and Distinct Targets. *J Infect Dis.* 1 févr 2004;189(3):540-51.
306. Gravity-dependent production of antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy - PubMed [Internet]. [cité 27 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/sirius.parisdescartes.fr/11705924/>
307. Duffy PE, Fried M. Antibodies That Inhibit *Plasmodium falciparum* Adhesion to Chondroitin Sulfate A Are Associated with Increased Birth Weight and the Gestational Age of Newborns. *Infect Immun.* nov 2003;71(11):6620-3.
308. Chaisavaneeyakorn S, Moore JM, Mirel L, Othoro C, Otieno J, Chaiyaroj SC, et al. Levels of macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in intervillous blood plasma samples from women with placental malaria and human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* juill 2003;10(4):631-6.
309. Suguitan AL, Cadigan TJ, Nguyen TA, Zhou A, Leke RJI, Metenou S, et al. Malaria-associated cytokine changes in the placenta of women with pre-term deliveries in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg.* déc 2003;69(6):574-81.
310. Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, Abrams ET, Tadesse E, Lema VM, et al. Placental Tumor Necrosis Factor Alpha but Not Gamma Interferon Is Associated with Placental Malaria and Low Birth Weight in Malawian Women. *Infect Immun.* janv 2003;71(1):267-70.
311. Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, et al. Malaria and Pregnancy: Placental Cytokine Expression and Its Relationship to Intrauterine Growth Retardation. *J Infect Dis.* déc 1999;180(6):1987-93.

312. Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, et al. *Plasmodium falciparum* Induces a Th1/Th2 Disequilibrium, Favoring the Th1-Type Pathway, in the Human Placenta. *J Infect Dis.* 15 mai 2001;183(10):1530-4.
313. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? *Trends Parasitol.* sept 2004;20(9):425-32.
314. Beeson JG, Amin N, Kanjala M, Rogerson SJ. Selective accumulation of mature asexual stages of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the placenta. *Infect Immun.* oct 2002;70(10):5412-5.
315. Shulman CE, Marshall T, Dorman EK, Bulmer JN, Cutts F, Peshu N, et al. Malaria in pregnancy: adverse effects on haemoglobin levels and birthweight in primigravidae and multigravidae. *Trop Med Int Health TM IH.* oct 2001;6(10):770-8.
316. Granja AC, Machungo F, Gomes A, Bergström S, Brabin B. Malaria-related maternal mortality in urban Mozambique. *Ann Trop Med Parasitol.* avr 1998;92(3):257-63.
317. Bloland P, Slutsker L, Steketee RW, Wirima JJ, Heymann DL, Breman JG. Rates and risk factors for mortality during the first two years of life in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(1 Suppl):82-6.
318. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis.* mai 2000;181(5):1740-5.
319. Redd SC, Wirima JJ, Steketee RW, Breman JG, Heymann DL. Transplacental transmission of *Plasmodium falciparum* in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(1 Suppl):57-60.

320. King CL, Malhotra I, Wamachi A, Kioko J, Mungai P, Wahab SA, et al. Acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in the human fetus. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 janv 2002;168(1):356-64.
321. Tuikue Ndam NG, Salanti A, Bertin G, Dahlbäck M, Fievet N, Turner L, et al. High Level of var2csa Transcription by *Plasmodium falciparum* Isolated from the Placenta. *J Infect Dis*. 15 juill 2005;192(2):331-5.
322. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria - PubMed [Internet]. [cité 27 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.sirius.parisdescartes.fr/15520249/>
323. Fried M, Duffy PE. Designing a VAR2CSA-based vaccine to prevent placental malaria. *Vaccine*. déc 2015;33(52):7483-8.
324. Clausen TM, Christoffersen S, Dahlbäck M, Langkilde AE, Jensen KE, Resende M, et al. Structural and functional insight into how the *Plasmodium falciparum* VAR2CSA protein mediates binding to chondroitin sulfate A in placental malaria. *J Biol Chem*. 6 juill 2012;287(28):23332-45.
325. Bigey P, Gnidehou S, Doritchamou J, Quiviger M, Viwami F, Couturier A, et al. The NTS-DBL2X Region of VAR2CSA Induces Cross-Reactive Antibodies That Inhibit Adhesion of Several *Plasmodium falciparum* Isolates to Chondroitin Sulfate A. *J Infect Dis*. 1 oct 2011;204(7):1125-33.
326. Doritchamou J, Bigey P, Nielsen MA, Gnidehou S, Ezinmegnon S, Burgain A, et al. Differential adhesion-inhibitory patterns of antibodies raised against two major variants of the NTS-DBL2X region of VAR2CSA. *Vaccine*. 23 sept 2013;31(41):4516-22.
327. High efficacy of anti DBL4 ϵ -VAR2CSA antibodies in inhibition of CSA-binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from pregnant women. - Abstract - Europe PMC [Internet]. [cité 27 juill 2020]. Disponible sur: <https://europepmc-org.sirius.parisdescartes.fr/article/med/21075162>

328. Nielsen MA, Resende M, de Jongh WA, Ditlev SB, Mordmüller B, Houard S, et al. The Influence of Sub-Unit Composition and Expression System on the Functional Antibody Response in the Development of a VAR2CSA Based *Plasmodium falciparum* Placental Malaria Vaccine. *PloS One*. 2015;10(9):e0135406.
329. Gbédandé K, Fievet N, Viwami F, Ezinmegnon S, Issifou S, Chippaux J-P, et al. Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PAMVAC: Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae. *Vaccine*. 14 2017;35(27):3474-81.
330. Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO. Quantifying the Number of Pregnancies at Risk of Malaria in 2007: A Demographic Study. Fisk NM, éditeur. *PLoS Med*. 26 janv 2010;7(1):e1000221.
331. Magistrado PA, Minja D, Doritchamou J, Tuikue Ndam N, John D, Schmiegelow C, et al. High efficacy of anti DBL4 ϵ -VAR2CSA antibodies in inhibition of CSA-binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from pregnant women. *Vaccine*. 10 janv 2011;29(3):437-43.
332. Whitty CJM, Edmonds S, Mutabingwa TK. Malaria in pregnancy. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. sept 2005;112(9):1189-95.
333. Functional Antibodies against Placental Malaria Parasites Are Variant Dependent and Differ by Geographic Region | *Infection and Immunity* [Internet]. [cité 4 août 2020]. Disponible sur: <https://iai.asm.org/content/87/7/e00865-18>
334. Kundu S. *BiomedRecent Advances in Immunoassays*. 2014.
335. Lima-Junior JDC, Morgado FN, Conceição-Silva F. How Can Elispot Add Information to Improve Knowledge on Tropical Diseases? *Cells*. déc 2017;6(4):31.
336. Shah HB, Koelsch KA. B-Cell ELISPOT: For the Identification of Antigen-Specific Antibody-Secreting Cells. In: Kurien BT, Scofield RH, éditeurs. *Western Blotting: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2015 [cité 15 nov 2021]. p.

- 419-26. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_42
337. Boonyaratanakornkit J, Taylor JJ. Techniques to Study Antigen-Specific B Cell Responses. *Front Immunol*. 24 juill 2019;10:1694.
338. Amiel C. Les cytokines en thérapeutique anti-infectieuse. *M ISE AU POINT*. 2000;13.
339. Masson E. Dosage des cytokines [Internet]. *EM-Consulte*. [cité 15 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/61263/dosage-des-cytokines>
340. Singh PP, Lucchi NW, Blackstock A, Udhayakumar V, Singh N. Intervillous macrophage migration inhibitory factor is associated with adverse birth outcomes in a study population in Central India. *PloS One*. 2012;7(12):e51678.
341. Chêne A, Briand V, Ibitokou S, Dechavanne S, Massougbodji A, Deloron P, et al. Placental Cytokine and Chemokine Profiles Reflect Pregnancy Outcomes in Women Exposed to *Plasmodium falciparum* Infection. *Infect Immun*. sept 2014;82(9):3783-9.
342. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19(1):683-765.
343. Schandené L, Alonso-Vega C, Willems F, Gérard C, Delvaux A, Velu T, et al. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol*. 1 mai 1994;152(9):4368-74.
344. Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol*. juin 2000;30(6):1683-90.
345. Ibitokou SA, Boström S, Brutus L, Ndam NT, Vianou B, Agbowai C, et al. Submicroscopic Infections with *Plasmodium falciparum* during Pregnancy and Their Association with Circulating Cytokine, Chemokine, and Cellular Profiles. *Clin Vaccine Immunol*. 1 juin 2014;21(6):859-66.

346. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature*. 29 oct 1998;395(6705):851-2.
347. Fried M, Kurtis JD, Swihart B, Morrison R, Pond-Tor S, Barry A, et al. Antibody levels to recombinant VAR2CSA domains vary with *Plasmodium falciparum* parasitaemia, gestational age, and gravidity, but do not predict pregnancy outcomes. *Malar J*. 9 mars 2018;17(1):106.
348. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. févr 2003;3(2):133-46.
349. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med*. 1 nov 1992;176(5):1387-98.
350. Perkins DJ, Weinberg JB, Kremsner PG. Reduced Interleukin-12 and Transforming Growth Factor— β 1 in Severe Childhood Malaria: Relationship of Cytokine Balance with Disease Severity. *J Infect Dis*. 1 sept 2000;182(3):988-92.
351. Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, et al. Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*. juill 2000;68(7):3909-15.
352. Keller CC, Yamo O, Ouma C, Ong'echa JM, Ounah D, Hittner JB, et al. Acquisition of Hemozoin by Monocytes Down-Regulates Interleukin-12 p40 (IL-12p40) Transcripts and Circulating IL-12p70 through an IL-10-Dependent Mechanism: In Vivo and In Vitro Findings in Severe Malarial Anemia. *Infect Immun*. 1 sept 2006;74(9):5249-60.
353. Fried M, Kurtis JD, Swihart B, Pond-Tor S, Barry A, Sidibe Y, et al. Systemic Inflammatory Response to Malaria During Pregnancy Is Associated With Pregnancy Loss and Preterm Delivery. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 nov 2017;65(10):1729-35.

354. El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased Expression of Pro-Inflammatory Cytokines in Placentas of Women Undergoing Spontaneous Preterm Delivery or Premature Rupture of Membranes. *Am J Reprod Immunol*. 1 juill 2004;52(1):45-52.
355. Raghupathy R, Al-Azemi M, Azizieh F. Intrauterine Growth Restriction: Cytokine Profiles of Trophoblast Antigen-Stimulated Maternal Lymphocytes. *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2012 [cité 4 oct 2019];2012. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3205724/>
356. Todryk SM. T Cell Memory to Vaccination. *Vaccines* [Internet]. 14 déc 2018 [cité 7 oct 2020];6(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6313890/>
357. Gbédandé K, Cottrell G, Vianou B, Ibitokou S, Fernando A, Troye-Blomberg M, et al. Infections with *Plasmodium falciparum* during pregnancy affect VAR2CSA DBL-5 domain-specific T cell cytokine responses. *Malar J*. 21 sept 2016;15(1):485.
358. Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, Siber GR. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. *Pharm Biotechnol*. 1995;6:229-48.
359. Comoy EE, Capron A, Thyphronitis G. In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *Int Immunol*. 1 avr 1997;9(4):523-31.
360. Mordmüller B, Sulyok M, Egger-Adam D, Resende M, de Jongh WA, Jensen MH, et al. First-in-human, Randomized, Double-blind Clinical Trial of Differentially Adjuvanted PAMVAC, A Vaccine Candidate to Prevent Pregnancy-associated Malaria. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 nov 2019;69(9):1509-16.
361. Gamain B, Smith JD, Miller LH, Baruch DI. Modifications in the CD36 binding domain of the *Plasmodium falciparum* variant antigen are responsible for the inability of chondroitin sulfate A adherent parasites to bind CD36. *Blood*. 15 mai 2001;97(10):3268-74.

362. Gamain B, Gratepanche S, Miller LH, Baruch DI. Molecular basis for the dichotomy in *Plasmodium falciparum* adhesion to CD36 and chondroitin sulfate A. Proc Natl Acad Sci U S A. 23 juill 2002;99(15):10020-4.
363. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu Rev Immunol. 2011;29:621-63.
364. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. Annu Rev Immunol. 2012;30:429-57.
365. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. J Exp Med. 15 févr 2010;207(2):353-63.
366. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. J Exp Med. 15 févr 2010;207(2):365-78.
367. MacLennan ICM, Toellner K-M, Cunningham AF, Serre K, Sze DM-Y, Zúñiga E, et al. Extrafollicular antibody responses. Immunol Rev. août 2003;194:8-18.
368. Olafsdottir TA, Lindqvist M, Nookaew I, Andersen P, Maertzdorf J, Persson J, et al. Comparative Systems Analyses Reveal Molecular Signatures of Clinically tested Vaccine Adjuvants. Sci Rep. 13 2016;6:39097.
369. Hill DL, Pierson W, Bolland DJ, Mkindi C, Carr EJ, Wang J, et al. The adjuvant GLA-SE promotes human Tfh cell expansion and emergence of public TCR β clonotypes. J Exp Med. 05 2019;216(8):1857-73.
370. Obeng-Adjei N, Portugal S, Tran TM, Yazew TB, Skinner J, Li S, et al. Circulating Th1 cell-type Tfh cells that exhibit impaired B cell help are preferentially activated during acute malaria in children. Cell Rep. 13 oct 2015;13(2):425-39.
371. Bowyer G, Grobbelaar A, Rampling T, Venkatraman N, Morelle D, Ballou RW, et al. CXCR3+ T Follicular Helper Cells Induced by Co-Administration of RTS,S/AS01B and

Viral-Vectored Vaccines Are Associated With Reduced Immunogenicity and Efficacy Against Malaria. *Front Immunol.* 2018;9:1660.

372. Desbien AL, Dubois Cauwelaert N, Reed SJ, Bailor HR, Liang H, Carter D, et al. IL-18 and Subcapsular Lymph Node Macrophages are Essential for Enhanced B Cell Responses with TLR4 Agonist Adjuvants. *J Immunol Baltim Md 1950.* 01 2016;197(11):4351-9.

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Répartition du Paludisme dans le monde (2).....	3
Figure 2 : Répartition géographique des marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments (10).....	4
Figure 3 : Cycle de vie du <i>Plasmodium</i> (24).	14
Figure 4. Mécanisme d'induction de la fièvre. Adapté de Anju et al., 2014 (43).	15
Figure 5 : Représentation schématique de la physiopathologie du paludisme grave (45).....	16
Figure 6 : Pathogénèse du neuro-paludisme au niveau de l'endothélium cérébral. Adapté de Gay et al., Revue Neurologique. 2012 (48).	17
Figure 7 : Schéma représentatif des interactions au cours du neuropaludisme (45).....	18
Figure 8 : Typical structure of PfPEMP1 (53).....	19
Figure 9 : Frottis sanguin coloré au MGG montrant un gamétoocyte de <i>P. falciparum</i>	24
Figure 10 : Goutte épaisse colorée au MGG des trophozoïtes de <i>P. falciparum</i> et deux noyaux de globules blancs.	25
Figure 11 : Trophozoïtes de <i>P. falciparum</i> colorés à l'acridine orange par la méthode QBC (73).....	26
Figure 12 : Les candidats vaccins contre le paludisme en développement clinique (100,101).	33
Figure 13. Représentation simplifiée des voies de signalisation induites par l'interaction PRR-PAMP dans l'immunité innée au cours du paludisme (153).	46
Figure 14. Rôle des cellules NK au cours des réponses immunitaires anti-palustre (174).....	50
Figure 15 : Représentation schématique du rôle des LT dans la réponse immunitaire contre le <i>Plasmodium</i> (178).....	52
Figure 16 : Représentation schématique du rôle des LTCD4 dans la réponse immunitaire humorale spécifique du <i>Plasmodium</i> (194).	55
Figure 17 : Représentation schématique des mécanismes de l'immunité anti-palustre médiée par les anticorps (194).....	57
Figure 18 : Représentation schématique de l'environnement placentaire au cours du paludisme placentaire (242).	61
Figure 19. Représentation schématique du placenta humain au cours du premier trimestre de gestation (253).	64
Figure 20 : Organisation schématique de la protéine VAR2CSA (323).....	76
Figure 21. Délimitation des sites d'étude STOPPAM, PLACMALVAC et PAMVAC.	82

Figure 22 : Suivi longitudinal d'une sous cohorte de l'étude STOPPAM.....	85
Figure 23 : Principe du dosage des cytokines par la technologie CBA (334).	86
Figure 24 Schéma représentatif du suivi longitudinal de la sous-cohorte de l'étude à Sô-Ava.	87
Figure 25 : Schéma représentatif du suivi des deux cohortes de l'étude PAMVAC.....	90
Figure 26 : Schéma représentatif des différentes étapes de la technique ELISpot (335).	91
Figure 27 : Caractérisation des différentes populations de lymphocytes T (A) et de lymphocytes B (B).....	94

Tableau 1 : Classification de l'endémicité du paludisme en fonction de l'indice splénique et du taux parasitaire	9
Tableau 2. Critères de gravité du paludisme chez l'adulte et l'enfant d'après l'OMS 2014...22	
Tableau 3 : Molécules de reconnaissance du <i>Plasmodium</i> et voies de signalisation	45